

DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DU PALUDISME HUMAIN PAR L'IMMUNO-FLUORESCENCE

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 21 Décembre 1964

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Pierre SALIOU

Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né le 20 Février 1940, à MORLAIX (29)



LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

—
1964

DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DU PALUDISME HUMAIN PAR L'IMMUNO-FLUORESCENCE

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 21 Décembre 1964

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Pierre SALIOU

Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Né le 20 Février 1940, à MORLAIX (29)



LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

—
1964

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens Honoraires	M. J. LEPINE, Membre de l'Institut.
Doyen	M. H. HERMANN, Correspondant de l'Institut.
Assesseurs	M. J.-F. CIER.
	MM. M. LEVRAT et L. REVOL.

Professeurs Honoraires : MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET, POLLOSSON.

PROFESSEURS

Clinique urologique	MM. CIBERT.	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique	MM. CREYSSSEL.
Physique biologique	PONTHUS (dét. à Beyrouth).	Clinique carcinologique ..	DARGENT.
		Anatomie pathologique ..	GUICHARD.
Clinique neuro-psychiatrique et hygiène mentale	DECHAUME.	Pathologie générale et expérimentale	GIRARD Paul.
Chimie organique et toxicologie	CHAMBON.	Anatomie	LATARJET.
Clinique chirurgicale P ..	WERTHEIMER.	Pathologie chirurgicale ..	PEYCELON.
Clinique médicale B	PAUPERT-RAVAULT.	Clinique médicale D	GIRARD Marcel.
		Pathologie médicale	VACHON.
Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires	FROMENT	Physio-pathologie des voies respiratoires	GALY.
Clinique médicale C	CROIZAT.	Radiologie	PAPILLON.
Chimie biologique et médicale	ENSELME.	Clinique médicale infantile et hygiène du 1 ^{er} âge .	JEUNE.
Clinique chirurgicale A ..	MALLET-GUY.	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale	GONIN.
Pharmacie galénique	REVOL.	Bactériologie	MONNET.
Clinique obstétricale	PIGEAUD.	Physiologie et pathologie obstétricales	BANSSILLON.
Médecine du travail	BOURRET.	Physiologie - B	CHATONNET.
Clinique médicale A	LEVRAT.	Clinique endocrinologique .	GUINET.
Hygiène et action sanitaire et sociale	SOHIER.	Clinique de chirurgie orthopédique	TRILLAT
Botanique et cryptogamie .	NETIEN.	Clinique stomatologique .	FREIDEL.
Clinique chirurgicale C ..	BERTRAND.	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles .	MARION
Chimie analytique pharmaceutique	BADINAND.	Matière médicale et législation pharmaceutique .	Joseph
Pharmacie chimique et pharmacologie	DREVON.	Histologie et embryologie .	DORCHE.
Médecine légale et déontologie	ROCHE.	Chimie	DUMONT Louis.
Parasitologie et pathologie exotique	COUDERT.	Physiologie A	PERROT.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phoniologie	MOUNIER-KUHN.	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire .	CIER J.-F.
Clinique ophtalmologique .	PAUFIQUE.	Clinique de chirurgie cardiaque	PERRIN J.
Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie	THIERS.	Clinique des maladies infectieuses	MICHAUD Pierre
Clinique de pneumo-phtisiologie	BRUN.	Biologie médicale et pharmacodynamie	X...
		Clinique gynécologique ..	X...
		Thérapeutique	X..

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine	MM. BERGER.
Bactériologie	BERTOYE.
Neuro-chirurgie	MANSUY.
Chimie générale et pharmaceutique	COLLET.
Clinique de pédiatrie et puériculture	SARROUY.
Hygiène et climatologie	LACROIX.
Clinique chirurgicale propédeutique	LIARAS.
Neuro-chirurgie	LECUIRE.
Médecine générale	REVOL.
Thérapeutique chirurgicale	GOINARD.
Pharmacie chimique et Pharmacologie	CIER André.
Médecine générale	PONT Maurice.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Parasitologie	MM. ROMAN.
Anatomie pathologique	FEROLDI.
Physique biologique	MORET.
Botanique et cryptogamie	ODDOUX.
Chimie analytique	de SOLLIERS.
Médecine générale	DESPIERRES.
Médecine du travail	TOLOT.
Parasitologie	GARIN.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

Chimie biologique	MM. CREYSSEL Roger.	Anesthésiologie	MM. MICHEL.
Hygiène	THIVOLET.	Pédiatrie et puériculture ..	FRANÇOIS.
Electro-radiologie	PINET.	Chirurgie générale	MICHOULIER.
Neuro-psychiatrie	GUYOTAT.	Dermatologie	COLOMB.
Chirurgie générale	DESCOTES.	Médecine générale	LAMBERT.
Pathologie expérimentale ..	JOUVET.	Médecine générale	FRIES.
Physique biologique	PEYRIN.	Pédiatrie	GILLY.
Anatomie pathologique ..	TOMMASI.	Médecine générale	ROBERT.
Electro-radiologie	BUFFARD.	Anatomie	BOUCHET.
Médecine générale et thé- rapeutique	LEJEUNE.	Pédiatrie	BETHENOD.
Stomatologie	de MOURGUES F.	Immunologie, sérologie, hé- matologie	GERMAIN.
Maladies infectieuses	NAUSSAC.	Pédiatrie	LARBRE.
Chirurgie générale	REBOUILLAT.	Chirurgie générale	SOUSTELLE.
Pédiatrie	ROMAGNY.	Médecine générale	VIALA.
Médecine générale	DELAHAYE.	Bactériologie, parasitologie, virologie	VINCENT.
Anesthésiologie	DELEUZE.	Pneumo-phthisiologie	KALB.
Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique	GIRAUD.		

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

Hématologie	MM. FAVRE-GILLY.	Biologie médicale et phar- macodynamie	MM. FAUCON.
Histologie et embryologie ..	GIROD.	Physiologie	FLANDROIS.
Chimie biologique	GRAS.	Bactériologie	VIALIER- RAYNARD.
Chimie analytique	MALEIN.		
Hygiène	RIFFAT.		

AGREGES EN EXERCICE

Ophthalmologie	MM. BONAMOUR.	Orthopédie	MM. FAYSSE.
Médecine légale	COLIN.	Oto-rhino-laryngologie ..	GAILLARD.
Chirurgie générale	de MOURGUES Georges.	Médecine générale	GARDE.
Médecine générale	DEVIC.	Ophthalmologie	HUGONNIER.
Obstétrique	DUMONT	Chirurgie générale	MARET.
	Martial.	Médecine générale	MORNEX.
Urologie	DURAND.	Médecine générale	NORMAND.
Chirurgie générale	FRANCILLON.	Stomatologie	PERRIN André.
Chirurgie générale	SAUBIER.	Obstétrique	DUMAS.
Neuro-psychiatrie	SCHOTT.	Médecine générale	GARMIER.
Neuro-chirurgie	ALLEGRE.	Orthopédie	NOEL.
Electro-radiologie	CHASSARD.		SCHNEPP.

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : M. COUDERT ; *Assesseurs* : MM. BERTOYE,
GARIN et THIVOLET

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation.



A MA FEMME

Faible témoignage de mon amour.

A MA FILLE

A MES PARENTS

Avec ma profonde affection.

A MA BELLE-MERE

Avec ma très grande admiration.

A MA SŒUR

A MES BEAUX-FRÈRES ET BELLES-SŒURS

A TOUTE MA FAMILLE ET BELLE-FAMILLE

A TOUS MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. COUDERT

Professeur de Parasitologie et Pathologie Exotique
Biologiste des Hôpitaux

Il nous fait le grand honneur de présider
notre jury de thèse.

Pendant deux années, il a bien voulu nous
accueillir avec bienveillance dans son labo-
ratoire. La profondeur et l'étendue de ses
connaissances ont fait notre admiration.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression
de notre respectueuse gratitude.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. BERTOYE

Professeur à titre personnel

Médecin des Hôpitaux

Nous le remercions de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à cette thèse.

Il nous a ouvert les portes de son service et nous a permis de consulter les observations de ses malades.

Il nous fait l'honneur de juger ce travail.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profond respect.

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. THIVOLET

Maître de Conférence Agrégé d'Hygiène

Médecin des Hôpitaux

Il a bien voulu accepter de juger cette thèse.

Sa présence dans notre jury a pour nous une signification toute spéciale, étant donnée sa très grande compétence en matière d'Immuno-fluorescence.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse considération.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J.-P. GARIN

¹Professeur sans chaire

Biologiste des Hôpitaux

Nous espérons être digne de la confiance qu'il nous a accordée en nous proposant le sujet de notre thèse.

Sa curiosité scientifique, l'aide compréhensive qu'il nous a apportée furent pour nous des encouragements constants.

Nous avons admiré la clarté de ses conceptions et la simplicité de son accueil.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre très respectueux dévouement.

A MONSIEUR LE DOCTEUR P. AMBROISE-THOMAS

Assistant au Laboratoire de Parasitologie et Pathologie exotique

Il nous a guidé pas à pas dans l'élaboration et la réalisation de ce travail. Nous avons bénéficié de son expérience de l'Immuno-fluorescence.

Il a su nous communiquer son enthousiasme et a bien voulu nous manifester sa sympathie à tous les instants.

Qu'il nous soit permis de lui exprimer notre reconnaissance et notre amitié.

A L'ENSEMBLE DE L'EQUIPE DU LABORATOIRE
DE PARASITOLOGIE ET DE PATHOLOGIE EXOTIQUE

A MADAME SIMON

Avec sa patience et sa gentillesse habituelles, elle a bien voulu nous initier aux méthodes de laboratoire.

Nous lui resterons toujours reconnaissant.

A MADemoisELLE LE DoctEUR M.-R. BATTESTI

Chef de travaux à la Faculté

Assistante de Biologie à l'Hôpital Edouard-Herriot

Nous la remercions d'avoir bien voulu accepter notre modeste concours aux séances de travaux pratiques.

A MESSIEURS LES DoctEURS MERIEUX

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ BENAZET

A MONSIEUR LE DoctEUR REQUET

A MONSIEUR LE DoctEUR VICARIA

Ils ont bien voulu nous apporter une aide précieuse au cours de ce travail.

Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

A MONSIEUR LE MÉDECIN GÉNÉRAL INSPECTEUR BORON

Professeur agrégé du Val-de-Grâce

*Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

A MONSIEUR LE MÉDECIN GÉNÉRAL CAMELIN

Professeur agrégé du Val-de-Grâce

Directeur du Service de Santé Militaire de la 8^e Région

A MONSIEUR LE MÉDECIN COLONEL GROSSETETE

Bactériologiste des Hôpitaux de l'Armée

Médecin-Chef de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes

A NOS MAÎTRES
DE LA FACULTE DE MEDECINE DE LYON
DES HOPITAUX CIVILS
DE L'HOPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION
DESGENETTES

A MONSIEUR LE MÉDECIN LIEUTENANT-COLONEL

J. VITTORI

Professeur agrégé du Val-de-Grâce

Chef du service de Chirurgie

Au cours du semestre passé dans son service, nous avons admiré son dynamisme et sa haute compétence.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueux attachement.

A MONSIEUR LE MÉDECIN LIEUTENANT-COLONEL

H. FELIX

Professeur agrégé du Val-de-Grâce

Chef du service de Médecine

Le semestre passé dans son service restera l'un des plus enrichissants de nos études.

Qu'il veuille bien accepter l'expression de notre profond respect.

INTRODUCTION

En 1880, LAVERAN découvrit l'agent causal du paludisme : l'hématozoaire qui porte son nom.

La découverte de ce parasite permet d'affirmer le diagnostic de la maladie de façon indiscutable. Mais cette recherche souvent délicate est en outre susceptible d'être vaine.

Aussi, en 1908, à l'Assemblée de la British Medical Association, Sir Patrick MANSON disait-il : « Toute nouvelle méthode permettant de reconnaître qu'un malade est, ou non, atteint de paludisme devra être accueillie comme une nouvelle conquête de la médecine pratique ».

Depuis cette époque, des chercheurs étudièrent les propriétés du sérum paludéen. Cependant, les problèmes posés par l'immunologie du paludisme ne sont pas entièrement résolus de nos jours et sont encore l'objet de nombreux travaux.

Dans la première partie de notre étude, nous essaierons de dégager ce qu'il faut retenir des principales recherches ayant porté sur l'immunologie du paludisme par des procédés de sérologie classique. Dans ce cadre entrent les différentes réactions de floculation auxquelles de nombreuses publications ont été consacrées, mais dont la spécificité est nulle. Nous les envisagerons donc brièvement.

Puis, dans une deuxième partie, nous tenterons de dresser le bilan des possibilités qu'offre en ce domaine l'immuno-fluorescence qui, au cours de ces dernières années, a pris la relève des autres réactions immunologiques.

Nous avons dans ce sens essayé de mettre au point une technique de diagnostic sérologique du paludisme humain par la méthode indirecte d'immuno-fluorescence, en utilisant comme antigène *Plasmodium vivax* ou *Plasmodium cynomolgi bastianellii*.

Au cours de ce travail, nous envisagerons successivement :

PREMIERE PARTIE

L'IMMUNOLOGIE DU PALUDISME PAR LES MÉTHODES DE
SÉROLOGIE CLASSIQUE.

I. — *La sérologie non spécifique.*

Les réactions de floculation.

II. — *La sérologie spécifique.*

1. La réaction de fixation du complément.

2. Les réactions de précipitation et d'agglutination.

DEUXIEME PARTIE

L'IMMUNO-FLUORESCENCE DANS L'IMMUNOLOGIE PALU-
DÉENNE.

Chapitre I. — Applications de la méthode directe.

Chapitre II. — Applications de la méthode indirecte.

I. — *Travaux antérieurs.*

1. Etude synthétique des méthodes utilisées.

2. Résultats.

II. — *Travaux personnels.*

1. Essai de mise au point de la méthode indirecte pour le diagnostic immunologique du paludisme. Eléments matériels et technique proposée.
2. Résultats personnels.
 - Exposé : — Paludisme expérimental du singe.
— Paludisme expérimental de l'homme.
— Paludisme spontané.
 - Commentaires et discussion.

III. — *Apports de l'immuno-fluorescence à la compréhension de l'immunologie paludéenne.*

PREMIERE PARTIE

**L'IMMUNOLOGIE DU PALUDISME
PAR LES METHODES DE SEROLOGIE CLASSIQUE**

LA SEROLOGIE NON SPECIFIQUE : LES REACTIONS DE FLOCCULATION

Les premiers travaux en matière de sérologie paludéenne portent sur la réaction de fixation du complément et sur la réaction de précipitation. Ils restèrent, comme nous le verrons plus loin, sans résultats pratiques, aucun antigène satisfaisant n'ayant pu être préparé.

Cette difficulté d'obtention de l'antigène a conduit différents auteurs à s'orienter vers d'autres techniques : les réactions de flocculation :

- par un sel de fer, de la mélanine ou de l'hémozoïne (test de HENRY) ;
- en eau distillée (test de CHORINE) ;
- en eau formolée tamponnée (test de WOLFF).

En 1927, au Congrès pour l'avancement des Sciences de Constantine, HENRY communique une méthode originale de diagnostic sérologique du paludisme basée sur la supposition que le pigment ocre ferrugineux et le pigment mélanique trouvés par KELSH et KIERNER dans toutes les lésions anatomo-pathologiques du paludisme avaient des caractères antigéniques. Ces « endo-antigènes » (endogènes) pouvaient donner naissance à des anticorps.

HENRY met en évidence le **pouvoir flocculant des sérums paludéens** en présence d'antigènes homologues de ces endogènes malariques dont il était en effet impossible de se procurer une quantité suffisante.

HENRY imagine deux réactions :

- la ferro-floculation dont l'antigène est constitué par un sel de fer (albuminate-glycérophosphate) ;
- la mélano-floculation dont l'antigène est préparé à partir de choroïde d'œil de bœuf et qui fut la plus utilisée.

Plus tard, une nouvelle conception admettant que la nature du pigment palustre spécifique était l'hémozoïne, substance proche de l'hématine, HENRY utilise comme antigène pour sa réaction une hémozoïne artificielle préparée par ses soins.

La positivité des réactions de floculation de HENRY apparaît après le quatrième ou le cinquième accès de la maladie, s'accroît rapidement, et disparaît avec l'extinction du paludisme aigu. Pour leur auteur, leur spécificité tant clinique que biologique ne fut jamais douteuse.

LE BOURDELLÈS et LIÉGEOIS (1930) démontrent la valeur diagnostique de la « malaria-floculation » de HENRY, mais

ils mettent en cause sa spécificité biologique. Pour eux, la séro-floculation ne fait que traduire un état physico-chimique particulier des sérums assez spécial à l'infection palustre dans lequel interviennent des facteurs mixtes spécifiques et non spécifiques, « ces derniers mettant les sérums en état d'instabilité et facilitant l'objectivation de la floculation produite par les facteurs spécifiques ».

Ces travaux sont confirmés par MEERSSEMAN et LACOUR en 1934.

La même année (1934), CHORINE, PRUDHOMME et KÆCHLIN ne reconnaissent aucune spécificité à la « malaria-floculation ». En étudiant la floculation de divers sérums dilués à 1/10^e dans de l'eau distillée, ils constatent que, si les sérums normaux floclent peu ou pas, les sérums syphilitiques légèrement, les sérums paludéens, eux, floclent intensément. Ces auteurs vérifient que les résultats obtenus par ce procédé sont en concordance presque parfaite avec ceux que donne la réaction de HENRY qui se montre également très positive au cours de diverses affections hépatiques et au cours du Kala-Azar, en l'absence de paludisme.

Pour CHORINE, la séro-floculation palustre est sous l'influence des modifications des protéines du sérum. Les « antigènes homologues » de HENRY jouent seulement le rôle d'un « indicateur coloré » lorsque la floculation due aux euglobulines sériques augmentées se produit.

En ne lui attribuant aucune valeur spécifique, CHORINE propose cependant l'hydro-séro-floculation comme épreuve d'orientation ou de confirmation du diagnostic de paludisme.

Dans la même optique, WOLFF (1939) préfère la floculation du sérum paludéen dans de l'eau distillée formolée à 0,2 %, tamponnée à pH 7, 7.

Le mécanisme de la malaria-floculation est actuellement bien connu et admis par la plupart des auteurs. Il n'a rien de commun avec une réaction immunologique. SCHNEIDER

et HARTMANN (1955) ont pu démontrer que la mélanofloculation de HENRY est négative chez certains malades en accès palustre et ne témoigne pas de la présence de l'hématozoaire dans l'organisme du malade.

Au contraire, elle peut être positive chez des sujets qui n'ont jamais été paludéens, mais qui présentent une affection hépatique (hépatite virale, cirrhose décompensée...) ou une maladie hémolytique.

Or, sur le plan biologique, l'atteinte hépatique est pratiquement constante au cours du paludisme. Après un certain nombre d'accès, on voit apparaître des modifications des diverses épreuves dites « fonctionnelles hépatiques ». Vers le quatrième ou cinquième accès, les réactions de floculation de HANGER et de MAC LAGAN deviennent positives. En pratiquant parallèlement à ces réactions de « labilité plasmatique » la mélanofloculation de HENRY, SCHNEIDER et HARTMANN ont constaté que cette dernière devient positive en même temps que les autres réactions de floculation, et qu'elle se négative à peu près en même temps que l'on obtient le retour à la normale des autres épreuves.

ROCHE, dans sa thèse (1963) inspirée par le Professeur J. SCHNEIDER, étudiant, par électrophorèse sur papier, les différentes constantes sériques chez des malades subissant la malariathérapie, met en évidence surtout une diminution de l'albumine et une augmentation importante des gammaglobulines et des bêta 2 M globulines. Ces modifications, nettes au cinquième ou sixième accès de la maladie, disparues six semaines environ après le dernier accès, jouent un rôle primordial pour la positivité des réactions de « labilité plasmatique » y compris la « malaria-floculation ».

En somme, si :

- la mélanofloculation de HENRY,
- l'hydro-séro-floculation de CHORINE,
- le test de WOLFF,

furent largement utilisés, et le sont encore parfois, ils ne sont en rien spécifiques.

Depuis le début du siècle, cependant, de nombreux travaux eurent pour but de mettre au point des réactions immunologiques spécifiques pour le diagnostic du paludisme. Nous les envisageons maintenant.

LA SEROLOGIE SPECIFIQUE

1. — Réaction de fixation du complément

Pour le diagnostic sérologique spécifique du paludisme, c'est vers la réaction de fixation du complément que les chercheurs se tournèrent en premier lieu.

Le premier travail sur ce sujet est celui de DE BLASI, en 1907, qui utilise comme antigène des hématies très parasitées pulvérisées.

Cette tentative ne donne aucun résultat et, en 1911, FERRANNINI reprend la question, mais cette fois avec des extraits aqueux et alcooliques de rate de paludéen. Il lui est impossible de détecter des anticorps dans le sérum des paludéens par la réaction de fixation du complément.

Par contre, en 1913, GASBARINI obtient des résultats très prometteurs. Son antigène est obtenu à partir d'hématies très parasitées, lavées dans du sérum physiologique, lysées dans de l'eau distillée, déshydratées et traitées de nouveau par du sérum physiologique.

Des 28 sérums de paludéens étudiés, 24 donnent des résultats positifs ; 16 sérums de contrôle sont négatifs.

Ce travail apporte une preuve de la réalité des anticorps spécifiques apparus au cours du paludisme, et montre qu'ils peuvent être mis en évidence par la réaction de fixation du complément.

Le principal problème lié à cette réaction consiste à obtenir un matériel antigénique suffisant et satisfaisant.

THOMSON (1919) tente bien de surmonter cette difficulté en essayant de cultiver des Plasmodiums, mais sans succès.

Par la suite, plusieurs auteurs imaginèrent d'utiliser comme source d'antigène, non seulement les hématies du sang périphérique, mais aussi celles provenant de différents organes : cerveau, foie, cœur, rate, placenta. C'est ainsi qu'en 1924, HORROWITZ et WLASSOWA ont recours à des macérations de placentas recueillis après l'accouchement des femmes paludéennes.

Les témoins sont constitués par des extraits de placenta normaux qui, contrairement aux précédents, ne donnent aucune réaction de fixation du complément positive.

Toutefois, il semble que les meilleurs résultats sont malgré tout obtenus lorsque l'antigène est préparé à partir du sang périphérique. En effet, recourir à des extraits de différents organes est susceptible d'introduire dans la réaction des facteurs capables soit de l'inhiber, soit de la fausser.

Après l'échec de MANSON-BAHR (1927), qui veut utiliser un antigène préparé à partir d'oocystes provenant d'*Anophèles*, KINGBURY (1927) revient donc à des hémolysats d'hématies parasitées par *Plasmodium vivax* et *Plasmodium falciparum*. En étudiant des immunsérums spécifiques de *P. vivax* et de *P. falciparum*, il met en évidence, pour la première fois semble-t-il, des réactions croisées entre ces deux espèces.

Mais il faut attendre les travaux de COGGESHALL et EATON (1938-1939) pour se rendre compte du progrès de l'immunologie paludéenne.

En 1938, ces auteurs étudient la courbe d'apparition des anticorps fixant le complément chez des Singes rhésus parasités expérimentalement par *Plasmodium knowlesi*.

Leur antigène est préparé de la manière suivante : à partir du sang splénique de ces animaux intensément parasités, ils libèrent les Plasmodiums des hématies par une suite de congélations et de décongélations ou par une longue

autolyse. Les hématozoaires sont ensuite extraits et dilués dans une solution de Na Cl à 1 %.

Les anticorps apparaissent dans le sérum des singes précocement au cours de la maladie et persistent tout au long de l'infection chronique. Leur titre n'est jamais élevé.

L'année suivante (1939), COGGESHALL et EATON étendent leurs études au paludisme humain. A l'aide du même antigène que précédemment (préparé à partir de *P. knowlesi*), ils mettent en évidence des anticorps fixant le complément dans les sérums de malades ayant acquis un paludisme naturel ou subissant la malariathérapie par *P. vivax* ou *P. falciparum*. Ces anticorps persistent pendant un an après l'infection.

De leurs travaux, les auteurs concluent la spécificité de la réaction de fixation du complément au cours du paludisme ; mais il s'agit d'une réaction spécifique de groupe et non d'espèce.

DULANEY, STRATMAN-THOMAS et WARR (1940-1941) veulent alors fixer la valeur de la réaction de fixation de complément pour le diagnostic du paludisme.

Pour leurs réactions, confirmant la spécificité de groupe, ils utilisent l'antigène « *P. knowlesi* » de COGGESHALL et EATON.

Leurs travaux portent sur des paludismes naturels et des paludismes d'inoculation. Les résultats sont concordants.

En cas d'impaludation volontaire, la parasitémie est patente avant l'apparition des anticorps fixant le complément dont le titre, jamais élevé, chutera rapidement après l'administration de Quinine. La réaction de fixation du complément persiste rarement plus d'un mois après la disparition des parasites.

Il en est de même au cours du paludisme naturel. Mais un traitement très précoce peut empêcher la mise en évidence des anticorps. Chez 125 malades présentant des lames

de sang positives à *P. vivax* ou à *P. falciparum*, ils obtiennent des réactions positives dans 81,6 % des cas.

Tout en reconnaissant la valeur et la spécificité de la réaction de fixation du complément, DULANEY et ses collaborateurs considèrent pourtant la lame de sang comme étant la méthode de diagnostic de choix du paludisme.

Pour augmenter la sensibilité de la réaction, DULANEY et MORRISON (1944) tentent d'améliorer l'antigène « *P. knowlesi* », qui deviendrait six à huit fois plus puissant sous l'influence d'un tampon au véronal.

En utilisant ce nouvel antigène, DULANEY et WATSON (1945) mettent en évidence des anticorps fixant le complément au cours de rechutes de paludisme à *P. vivax*, alors que les lames de sang sont négatives.

Les derniers travaux importants sur la réaction de fixation du complément au cours du paludisme humain semblent être ceux de REIN, BUKANTZ, KENT, COOPER, RUHE et COATNEY (1949) qui utilisent l'antigène « *P. knowlesi* » préparé selon la méthode de DULANEY et MORRISON.

Ils étudient les sérums, dilués à 1/5°, de 87 volontaires impaludés par *P. vivax*. Ils confirment la plupart des résultats des travaux précédents :

- la réaction de fixation du complément est spécifique de groupe ;
- elle devient positive à peu près une semaine après l'apparition des Plasmodiums dans le sang périphérique et le demeure peu de temps (une quarantaine de jours) après l'extinction du paludisme aigu ;
- en cas de rechutes, des anticorps fixant le complément peuvent être détectés alors que la lame de sang colorée ne révèle pas de parasites.

Entre temps, de nombreux auteurs, se basant sur la spécificité de la réaction de fixation du complément, utilisent des antigènes préparés à partir d'autres Plasmodiums.

En 1945, LIPPINCOTT, GORDON, HESSEL-BROCK et MARBLE, reprenant les essais de KLIGER et YÆLI (1941), préparent leur antigène à partir du Plasmodium des volailles (*P. gallinaceum*).

Ils mettent en suspension dans du sérum physiologique des hématies, préalablement lyophilisées, de poulets parasités.

Avec ce matériel antigénique ils étudient les sérums, non dilués, de 9.111 soldats ayant contracté le paludisme dans le Pacifique Sud. Parmi eux, certains présentent encore des accès au moment de l'expérimentation.

La réaction de fixation du complément n'est positive que dans 30 % des cas seulement, se révélant parfois constamment négative chez des sujets en accès. Les sérums donnant lieu à des réactions positives sont alors dilués. La positivité de la réaction ne se manifeste plus que dans 40 % et 4 % des cas pour des dilutions sériques respectives de $1/5^{\circ}$ et de $1/30^{\circ}$.

LIPPINCOTT et ses collaborateurs n'attribuent donc qu'une très faible sensibilité à la réaction de fixation du complément réalisée avec l'antigène *P. gallinaceum*.

Pour HARRIS et REIDEL (1948), la sensibilité de la réaction serait cependant plus forte avec l'antigène *P. gallinaceum* qu'avec l'antigène *P. knowlesi*.

Tous ces essais — auxquels on peut ajouter celui de DAVIS (1948) dont l'antigène, préparé à partir de *P. lophuræ* (hématozoaire du canard), réagirait avec le sérum de singes infectés par *P. knowlesi* — admettent comme réelle la spécificité de groupe de la réaction de fixation du complément réalisée pour la détection des anticorps du paludisme.

Cependant, dès 1946, la réaction de fixation du complément est considérée comme spécifique d'espèce par MAYER et HEIDELBERGER.

En effet, ils ne peuvent obtenir de réactions croisées entre *P. vivax* et *P. falciparum*.

A partir d'hématies parasitées par *P. vivax*, ces auteurs séparent les parasites du stroma des globules rouges par centrifugation différentielle. Auparavant, les hématies ont été congelées puis décongelées et remises en suspension dans du sérum physiologique. Le culot de centrifugation est utilisé comme antigène.

Avec cette préparation, ils cherchent à détecter les anticorps fixant le complément dans le sérum de malades mentaux impaludés soit par *P. falciparum*, soit par *P. vivax*.

La réaction est toujours négative avec les sérums présumés anti-*P. falciparum*.

En cas de réaction positive, avec les sérums anti-*P. vivax* il est toutefois nécessaire d'effectuer des contrôles de spécificité :

- afin d'écarter une fausse réaction positive, MAYER et HEIDELBERGER utilisent un antigène préparé comme précédemment, mais à partir d'hématies non parasitées ;
- la syphilis doit être éliminée, car les sérums syphilitiques donnent fréquemment des réactions de fixation du complément positives avec l'antigène malarique.

SOMME TOUTE, QUE NOUS APPORTE LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT EN CE QUI CONCERNE LE SÉRO-DIAGNOSTIC DU PALUDISME HUMAIN ?

Indiscutablement, les essais de mise au point de la réaction de fixation du complément constituent des tentatives intéressantes. Il s'agit d'une réaction commode, très largement utilisée dans tous les laboratoires qui sont équipés pour sa réalisation.

Cependant, au passif de cette méthode, il faut inscrire :

- la nécessité d'utiliser un antigène difficile à préparer (ceci ne constitue d'ailleurs qu'un aspect particulier d'un problème très général en parasitologie,

malgré un certain nombre de recherches tendant à perfectionner et à standardiser la préparation et la conservation des antigènes dont les travaux de notre Maître J. COUDERT et de son école) ;

- sa faible sensibilité, les taux des sérums positifs étudiés ne dépassant jamais le 1/30°.
- sa très relative spécificité (il s'agit là aussi d'un caractère général de la réaction de fixation du complément en parasitologie). En effet, des sérums indubitablement positifs ont été trouvés négatifs et inversement. D'autre part, il existe des risques de confusion avec la syphilis. Enfin, la spécificité de groupe de la réaction peut être controversée en particulier si *P. gallinaceum* est utilisé comme antigène puisque des études ultérieures (VOLLER, 1962) ont montré par des moyens très spécifiques (immuno-fluorescence) qu'il n'y avait aucune parenté antigénique entre cet hématozoaire et les *Plasmodiums* humains.

2. — Réactions de Précipitation et d'Agglutination

a) La réaction de précipitation

En 1918, PEWNY, le premier, met en évidence des précipitines dans le sérum des paludéens. Il prépare un antigène malarique à partir de sang parasité qu'il laisse hémolyser plusieurs jours à 37° C. Après centrifugation, il utilise, comme antigène, le surnageant, dilué dans du sérum physiologique.

Les sérums de paludéens, dilués à 1/100°, mis en présence de cette suspension, précipitent au bout de 24 heures. PEWNY précise qu'il ne semble pas exister de fausses réactions positives.

Les travaux sur la réaction de précipitation sont repris en 1927 par W.H. et L.G. TALIAFERRO et A.B. FISHER.

L'antigène :

Des placentas de femmes paludéennes parasitées par *P. falciparum* sont broyés. Le broyat, traité préalablement par de l'éther, puis par une solution de liqueur de Coca est filtré. Le filtrat constitue le matériel antigénique.

La réaction :

Dans un tube à hémolyse, un volume de cet antigène est ajouté à un volume identique du sérum à étudier. Le tube est mis à l'étuve à 37° C pendant une heure, puis laissé quelques heures au réfrigérateur.

En cas de réaction positive, il se forme un anneau de précipitation que les auteurs considèrent comme témoin d'une véritable réaction immunologique, et non pas comme une réaction de floculation non spécifique.

L'année suivante (1928), W.H. et L.G. TALIAFERRO modifient légèrement l'antigène en l'ajustant à pH 7, 8 ; ce qui augmenterait la sensibilité de la réaction. Etudiant 86 sérums de paludéens, ils obtiennent alors 75 réactions de précipitation positives. Ils effectuent systématiquement des contrôles à l'aide de sérums sains : peu de fausses réactions positives sont à retenir.

D'autre part, ils constatent par cette technique des réactions croisées entre *P. vivax* et *P. falciparum*.

La réaction de précipitation semble donc être spécifique de groupe.

En 1929, W.H. TALIAFERRO entreprend une nouvelle série d'expérimentations réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Mais les résultats ne sont pas satisfaisants.

Devant de telles variations, W.H. TALIAFERRO se refuse à proposer la réaction de précipitation comme méthode de diagnostic du paludisme.

Row (1931) tente bien de surmonter cette difficulté en essayant de cultiver des Plasmodiums, mais sans succès. Il réussit toutefois à entretenir en survie dans des tubes pendant plusieurs jours des hématies parasitées par *P. vivax* et *P. falciparum*. Ces hématies sont ensuite lavées dans du sérum physiologique, hémolysées dans de l'eau distillée, puis centrifugées à grande vitesse. Le sédiment, après dessiccation à 37° C, est remis en suspension dans 20 fois son volume de sérum physiologique. Cette préparation opalescente constitue l'antigène qui, mis en présence d'un sérum paludéen, provoque des anneaux de précipitation.

Row lui-même ne reconnaît aucun avenir à la réaction, du fait :

- de sa spécificité douteuse ;
- de sa faible sensibilité ;
- de l'impossibilité de se procurer une quantité suffisante d'antigène.

b) Les réactions d'agglutination

EATON (1938) met en évidence des anticorps agglutinants dans le sérum de Singes rhésus parasités par *P. knowlesi*.

Pour une bonne réalisation de la réaction d'agglutination, l'auteur constate qu'il est nécessaire d'utiliser comme antigène une suspension, dans du sérum physiologique, d'hématies dont au moins 50 % sont parasitées par des formes *matures* de *P. knowlesi* provenant de Singes impaludés.

La réaction s'effectue dans des tubes à hémolyse où le sérum à étudier (préalablement décomplémenté par chauffage à 56° C pendant 30 minutes) et l'antigène sont laissés à réagir pendant 2 heures à la température ambiante. Au bout de ce temps, l'agglutination des hématies antigéniques est observée macroscopiquement et microscopiquement.

Au cours de ses travaux, EATON étudie le sérum de différents singes impaludés par *P. knowlesi*, à tous les stades de la maladie.

Les anticorps agglutinants apparaissent tardivement entre le quinzième et le quarantième jour après l'impaludation. Mais ils persistent longtemps (un an et plus) dans le sérum des Singes. Ceci explique l'immunité relative de ces animaux à une réimpaludation.

La réaction d'agglutination est spécifique : EATON n'obtient aucune agglutination, ni avec des sérums normaux, ni avec des sérums de Singes parasités par *P. inui*.

Elle est de plus sensible : des réactions positives peuvent se produire avec des dilutions sériques atteignant 1/1.000°.

Mais cette réaction n'a jamais été utilisée pour l'étude immunologique du paludisme humain, les qualités exigées de l'antigène (au moins 50 % des hématies parasitées par des *hématozoaires matures*) rendant sa préparation très difficile.

En 1941, DULANEY et HOUSE tentent de mettre au point une réaction d'agglutination sur support.

L'antigène est préparé à partir de sang parasité par *P. knowlesi*. Les hématies, ayant subi une dessiccation préalable, sont traitées par de l'hydroxyde de sodium. Après neutralisation, la solution est centrifugée à grande vitesse. Le surnageant est utilisé pour enduire des particules de collodion.

Cette préparation est mise en présence de sérums de sujets parasités par diverses espèces de *Plasmodiums*. Dans la grande majorité des cas, DULANEY et HOUSE observent alors l'agglutination des particules antigéniques. Mais les fausses réactions positives obtenues avec des sérums de malades indemnes de paludisme sont nombreuses.

Cette réaction, apparemment très peu spécifique, reste sans lendemain.

Récemment, STEIN et DESOWITZ détectent des anticorps chez des paludéens par la **réaction d'hémagglutination**.

Des hématies de Mouton, traitées par de l'acide tannique, sont sensibilisées par *P. vivax* extrait dans du sérum physiologique à partir d'hématies parasitées.

Les auteurs enregistrent l'hémagglutination de ces hématies de Mouton sensibilisées, lorsqu'elles sont mises à réagir avec des antisérums *P. vivax* de titre élevé (de $1/400^{\circ}$ à $1/25.600^{\circ}$).

Des contrôles sont effectués :

— L'hémagglutination ne se produit jamais avec un antigène préparé à partir d'un sang non infecté.

— Avec l'antigène spécifique, quelques sérums de sujets sains donnent lieu à des réactions positives, mais à des titres de dilution beaucoup plus bas que ceux des sérums des malades.

De plus, STEIN et DESOWITZ observent des réactions croisées entre les immunsérums *P. vivax* et les antigènes *P. cynomolgi* et *P. berhgei*.

Pour ces auteurs, la réaction d'hémagglutination ne requiert qu'une quantité infime d'antigène protéique. Elle permet peut-être ainsi de surmonter l'obstacle, toujours rencontré jusqu'ici, que constitue l'obtention d'un matériel antigénique en quantité suffisante. Les travaux se poursuivent actuellement.

Mise à part la récente réaction d'hémagglutination de STEIN et DESOWITZ, qui semble très prometteuse, aucune des techniques de sérologie classique ne constitue, du moins à l'heure actuelle, un moyen de diagnostic valable du paludisme humain.

Nous ne reviendrons pas sur le manque de spécificité, admis généralement aujourd'hui, des réactions de floculation.

En ce qui concerne les méthodes « spécifiques », nous avons vu tout au long de cette étude que les recherches se heurtèrent à la préparation d'un bon antigène en quantité suffisante, ce qui impliquait évidemment l'utilisation d'un sang très parasité. Aussi les auteurs ont-ils tenté d'employer tour à tour différents *Plasmodiums* provenant d'animaux dont la parasitémie, facilement contrôlable au laboratoire, peut être intense (*P. gallinaceum*, *P. lophuræ*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi*, *P. bergheï*).

Les discordances de nombreux résultats s'expliquent par la nature même de ces *Plasmodiums* animaux, certains d'entre eux n'ayant aucune chance de constituer un antigène utilisable pour le séro-diagnostic du paludisme humain.

En effet, il est actuellement possible de procéder à l'analyse antigénique des *Plasmodiums* par immuno-électrophorèse. ZUCKERMAN et SPIRA, les premiers (1962, 1964), ont étudié la composition antigénique des *Plasmodiums* des rongeurs (*P. vinckeï* et *P. bergheï*) et des gallinacés.

De leur côté, BANKI et BUCCI ont comparé, par cette méthode, *P. bergheï* et *P. cynomolgi*. Au récent Congrès International de Parasitologie à Rome, ces auteurs communiquent que ces deux espèces de *Plasmodiums* sont antigéniquement différentes.

Il est d'ailleurs possible que, dans l'avenir, l'immuno-électrophorèse objective d'importantes différences antigéniques entre les *Plasmodiums* humains et la plupart des *Plasmodiums* animaux.

Déjà, par Immuno-fluorescence, VOLLER (1962) a pu montrer la très faible parenté immunologique de *P. vivax* avec *P. bergheï* et *P. gallinaceum*. Comme toujours, il semble exister un ou plusieurs groupements antigéniques communs à tous les *Plasmodiums*, chaque espèce présentant en outre des antigènes qui lui sont propres. C'est le rapport entre ces deux types d'antigènes qui conditionne l'utilisation possible d'un *Plasmodium* animal pour le séro-diagnos-

tic du paludisme humain. On conçoit donc que l'emploi de certains parasites explique la faible sensibilité de la réaction de fixation du complément, entre autres réactions, qui ne peut détecter des antigènes de groupe que pour une faible dilution des sérums étudiés. Par contre, certains *Plasmodiums* animaux, en particulier *P. cynomolgi bastianellii*, semblent très proches des *Plasmodiums* humains. Nous aurons l'occasion de revenir longuement sur leur utilisation possible pour le diagnostic immunologique du paludisme de l'homme.

DEUXIEME PARTIE

**L'IMMUNO-FLUORESCENCE
DANS L'IMMUNOLOGIE PALUDEENNE**

La technique d'IMMUNO-FLUORESCENCE de COONS peut être utilisée dans deux voies différentes ⁽¹⁾ :

— La méthode directe, où un immunsérum spécifique conjugué, utilisé comme « colorant à tête chercheuse », permet l'identification rapide et sélective de l'antigène correspondant.

— La méthode indirecte qui, par le biais d'un conjugué anti-gamma-globulines humaines, constitue une réaction sérologique proprement dite.

A propos du paludisme, l'Immuno-fluorescence semble être utilisable par l'un ou l'autre procédé, pour la détection rapide d'hématozoaires même très rares, ou pour le diagnostic sérologique du paludisme.

Dans ce dernier domaine, elle présente sur les méthodes de sérologie classique une supériorité importante qui tient :

— à la grande spécificité et à la sensibilité élevée qui résultent du principe même de cette technique ;

— à l'utilisation possible, comme antigène, de simples lames de sangs parasités sans qu'une extraction préalable des hématozoaires ne soit nécessaire.

(1) Le principe des deux techniques a été largement exposé par différents auteurs (les principales références sont rapportées dans la bibliographie), en particulier par P. AMBROISE-THOMAS dans sa thèse.

CHAPITRE I

APPLICATIONS DE LA METHODE DIRECTE

Chaque fois qu'un auteur envisage une nouvelle application de l'Immuno-fluorescence, il commence presque toujours par recourir à la méthode directe pour s'assurer que le parasite, le germe microbien, ou l'élément viral considérés constituent bien un antigène satisfaisant.

Il est donc logique de commencer l'analyse des différents travaux tendant à appliquer la technique de COONS au paludisme par les recherches qui ont été effectuées par la méthode directe.

Dans ce domaine, la méthode « à une couche » a permis :

- la vérification que les frottis de sang parasité constituent un matériel antigénique convenable ;
- la différenciation immunologique des Plasmodiums humains et animaux ;
- la détection rapide et spécifique des hématozoaires, soit sur une lame de sang faiblement parasité, soit sur une coupe d'organe (pour les formes exoérythrocytaires) ;
- enfin des recherches d'ordre épidémiologique concernant les différents moustiques susceptibles d'être des hôtes intermédiaires et vecteurs pour les Plasmodiums.

1. — Utilisation de frottis sanguins parasités par des Plasmodiums comme antigène pour les réactions d'Immuno-fluorescence

Pour la première fois, en 1958, BROOKE, MELVIN et HEALY, au VI^e Congrès de Médecine Tropicale de Lisbonne, communiquent qu'ils ont pu mettre en évidence la fluorescence de *P. bergheï* sur un étalement traité préalablement par un immunosérum spécifique de Rat conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine.

Par la suite, INGRAM, OTKEN et JUMPER (1961) font agir pendant 30 minutes, sur des lames de *P. cynomolgi bastianellii*, des sérums conjugués de singes *Macacca mulatta* parasités expérimentalement par ce même Plasmodium. Les *P. cynomolgi* présentent alors une fluorescence nette, mais peu intense. Des contrôles sont effectués :

— un sérum normal conjugué, ou un immunosérum spécifique préalablement absorbé par un excès d'antigène ne donnent aucune fluorescence, ce qui prouve la nature immunologique de la réaction ;

— si, avant de faire intervenir les anticorps marqués, on traite les frottis par un immunosérum non conjugué, il se produit une inhibition de la fluorescence : la spécificité est ainsi démontrée.

TOBIE et COATNEY (1961) appliquent avec succès la méthode directe au paludisme humain.

Les gamma-globulines du sérum d'un malade présentant un paludisme à *P. vivax* sont conjuguées à de l'isothiocyanate de fluorescéine. Cet immunosérum conjugué est mis à réagir pendant 30 minutes sur une lame de sang parasité par *P. vivax* et préalablement déshémoglobinisé. La préparation est ensuite lavée dans une solution isotonique tamponnée,

puis observée en microscopie ultra-violette. Une vive fluorescence jaune-vert apparaît alors au niveau du cytoplasme des Plasmodiums.

Les auteurs obtiennent des résultats identiques en traitant, selon la même technique, un étalement de *P. cynomolgi bastianellii* par le sérum conjugué d'un laborantin qui avait contracté accidentellement au laboratoire un paludisme à *P. cynomolgi bastianellii*.

Toutes les recherches ultérieures, que nous allons maintenant envisager, ont confirmé que les différents Plasmodiums présents dans les frottis sanguins constituent un antigène satisfaisant pour l'immuno-fluorescence. Ce résultat a pu être établi entre autres pour *P. malariae* et *P. falciparum*, *P. vinckeï*, *P. juxtannucleare*, *P. gonderi* et *P. osmaniae*.

Il semble donc bien s'agir là d'une propriété générale des hématozoaires qui peuvent réagir avec les immunsérums correspondants et, dans certains cas, avec des sérums spécifiques d'espèces voisines.

2. — Différenciation immunologique des Plasmodiums de l'Homme et des Animaux

Existe-t-il, grâce à l'Immuno-fluorescence, un moyen de distinction immunologique des différents Plasmodiums de l'Homme et des Animaux ? C'est ce que plusieurs auteurs tentent de préciser.

VOLLER (1962) s'est surtout attaché aux hématozoaires parasites des Muridés et des Gallinacés.

Pour cela, des frottis sanguins sont réalisés à partir de sang de Souris et de Rat pour *P. bergheï* et *P. vinckeï*, de poulet pour *P. gallinaceum* et *P. juxtannucleare*, de singe pour *P. cynomolgi bastianellii*, *P. gonderi* et *P. osmaniae*, et enfin de sang humain pour *P. vivax*.

Ces étalements sont mis à réagir avec des sérums conjugués anti-*P. bergheï*, anti-*P. gallinaceum* et anti-*P. juxta-*

nucleare, pendant 30 minutes à la température ambiante, en chambre humide.

Le conjugué anti-*P. bergheï* réagit très fortement avec *P. bergheï*, faiblement avec *P. vinckeï*, mais il ne provoque aucune fluorescence de *P. gallinaceum*, *P. juxtannucleare*, *P. cynomolgi bastianellii*, *P. gonderi*, *P. osmaniae* et *P. vivax*.

La spécificité est encore plus grande avec des conjugués anti-*P. gallinaceum* et anti-*P. juxtannucleare*, qui ne réagissent qu'avec les hématozoaires correspondants.

TOBIE et COATNEY (1961) remarquent que *P. bergheï*, traité par des immunosérums conjugués anti-*P. vivax* ou anti-*P. cynomolgi bastianellii*, donne une fluorescence pratiquement nulle.

Par contre, ces auteurs montrent l'existence de réactions croisées entre *P. vivax* et *P. cynomolgi bastianellii*.

Cette constatation entraîne, comme nous le verrons plus loin, d'importantes applications pour le séro-diagnostic du paludisme humain.

De cet ensemble de recherches, il est donc possible de déduire une CLASSIFICATION IMMUNOLOGIQUE DES PLASMODIUMS que VOLLER (1964) a d'ailleurs déjà proposée.

— Parasites des Oiseaux : *P. gallinaceum* (souches 8 A et 8 B) d'une part, *P. juxtannucleare* (souches 14 A et 14 C) d'autre part, présentent une stricte spécificité et ne réagissent chacun qu'avec les anticorps correspondants.

— Parasites des Rongeurs : *P. bergheï* et *P. vinckeï* donnent des réactions croisées entre eux.

— Parasites des Primates : *P. cynomolgi cynomolgi*, *P. cynomolgi bastianellii*, *P. falciparum*, *P. gonderi*, *P. inui*, *P. shortti* ; et *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, présentent également des propriétés communes, plus ou moins intenses selon les cas.

Par contre, l'Immuno-fluorescence ne met en évidence aucune réaction croisée entre ces trois groupes distincts.

Le pouvoir antigénique des Plasmodiums semble donc lié à la nature de l'espèce animale parasitée, et ceci dès le stade sporozoïte, comme ont pu le montrer les travaux de INGRAM, OTKEN et JUMPER (1961).

3. — La méthode directe utilisée comme méthode de coloration « à tête chercheuse »

Les résultats de tous les travaux précédents permettent d'envisager la méthode de COONS « à une couche » comme *moyen de diagnostic direct du paludisme*.

En effet, il est possible de préparer des immunsérums spécifiques conjugués et de les utiliser comme « colorants sélectifs ».

En réalité, notre expérience nous a montré que les parasites, souvent difficiles à identifier, brillent faiblement, et que d'autre part, différents éléments de la préparation peuvent prêter à confusion. Il serait donc simpliste d'imaginer que l'application d'immunsérum conjugué sur une lame de sang parasité laisse cet étalement parfaitement sombre et que seuls les Plasmodiums sont brillants. Il est toutefois possible d'augmenter le contraste entre la fluorescence des parasites et les fluorescences non spécifiques dans la mesure où l'on utilise des conjugués très purifiés et fabriqués à partir d'immunsérums de titre extrêmement élevé.

C'est à cette condition que des résultats valables ont déjà pu être obtenus.

Actuellement, la méthode directe semble surtout utilisée pour la *détection des formes exoérythrocytaires des Plasmodiums*. VOLLER et TAFFS (1963) mettent en évidence de telles formes dans le cerveau et le foie des gallinacés. Ces auteurs inoculent une poule avec du sang parasité par *P. gallinaceum*. Seize jours plus tard, ils la sacrifient. Des coupes de cerveau et de foie sont mises à réagir avec des sérums conjugués anti-*P. gallinaceum* et anti-*P. juxta-*

nucleare, et avec un sérum conjugué provenant d'une poule saine. Seules les coupes traitées par l'immunsérum spécifique *P. Gallinaceum* apparaissent fortement fluorescentes.

Par la même technique, INGRAM et CARVER (1963) confirment les résultats de VOLLER et TAFFS, non seulement à propos des *Plasmodiums* aviaires, mais aussi des *Plasmodiums* simiens.

4. — Intérêt épidémiologique de la méthode directe

Au VII^e Congrès International de Médecine Tropicale et du Paludisme de Rio de Janeiro (1963), CORRADETTI et ses collaborateurs émettent l'idée que l'identification, par la méthode de COONS, de sporozoïtes parasitant éventuellement des moustiques capturés dans la nature, pourrait faciliter l'éradication du paludisme.

Dans ce but, il est indispensable de disposer d'immunsérums spécifiques anti-sporozoïtes. On ne peut utiliser des sérums d'Hommes ou d'animaux paludéens, car, au cours d'un paludisme, toutes les formes évolutives d'un *Plasmodium* sont plus ou moins présentes simultanément. Mais la difficulté peut être tournée en injectant des sporozoïtes d'une espèce de *Plasmodium* à un animal non réceptif à cette espèce. Cette injection ne saurait être suivie d'un paludisme expérimental ; par contre, l'animal élabore des anticorps anti-sporozoïtes.

Cette technique a été imaginée par INGRAM, OTKEN et JUMPER (1961), qui injectent une suspension de sporozoïtes *P. gallinaceum* (dont nous avons vu l'étroite spécificité) à des Lapins. Ce procédé a été utilisé de nouveau par CORRADETTI et ses collaborateurs, qui l'ont perfectionné en préparant une suspension injectable pratiquement pure de sporozoïtes *P. gallinaceum*. Ces derniers auteurs poursuivent leurs recherches, en particulier en ce qui concerne la standardisation des immunsérums conjugués anti-sporozoïtes.

Telles sont les principales applications possibles de la méthode directe de l'Immuno-fluorescence.

Toutefois, les travaux se concentrent actuellement surtout sur les possibilités de la méthode indirecte, qui semble constituer enfin un moyen valable pour le séro-diagnostic du paludisme.

CHAPITRE II

APPLICATIONS DE LA METHODE INDIRECTE

Travaux antérieurs

Les recherches portant sur l'application de la méthode indirecte de la technique de COONS à l'immunologie paludéenne sont le fait de VOLLER ; de KUVIN, TOBIE et COATNEY ; de COLLINS et de leurs collaborateurs.

Une étude successive des travaux effectués serait fastidieuse. Nous préférons donc grouper de façon synthétique les méthodes employées de manière à en dégager les principes généraux, puis envisager dans un deuxième temps l'ensemble des résultats obtenus.

1. — Etude synthétique des méthodes utilisées

A. — ANTIGENE

VOLLER et BRAY (1962) tentent d'utiliser des sporozoïtes et des ookinètes provenant respectivement des glandes salivaires ou du gastre de Moustiques infectés par *P. falciparum*. Ces éléments, étalés sur des lames microscopiques en verre, sont fixés dans de l'acétone ou utilisés tels quels.

Mais ce matériel antigénique ne donne pas de résultats satisfaisants. VOLLER et BRAY préfèrent un antigène constitué par des frottis sanguins parasités par *P. falciparum*.

Les autres auteurs utilisent aussi pour la préparation de leurs antigènes du sang parasité à partir duquel ils réalisent de minces étalements. La goutte épaisse ne semble jamais avoir été essayée.

A l'heure actuelle, tous les Plasmodiums humains et le Plasmodium simien *P. cynomolgi bastianellii* ont été utilisés.

L'antigène présente le grand avantage de pouvoir être conservé plusieurs mois au congélateur.

KUVIN et TOBIE, après plusieurs essais, à la température ordinaire, à $+ 4^{\circ}\text{C}$, à $- 20^{\circ}\text{C}$ et à $- 50^{\circ}\text{C}$, stockent leurs étalements à cette dernière température. Dans ces conditions, la fluorescence parasite n'est que très minime après un délai de 15 semaines.

D'après des travaux récents de VOLLER, de COLLINS, JEFFERY et SKINNER, la possibilité de conservation est encore augmentée si les lames sont mises en réserve à $- 70^{\circ}\text{C}$.

Avant d'être utilisés, les étalements sont déshémoglobinisés dans un bain de HCl à 0,1 % pendant 5 minutes, par tous les auteurs.

Par contre, la fixation préalable n'est préconisée que par COLLINS, qui plonge ses frottis dans de l'acétone pendant 30 minutes à $- 20^{\circ}\text{C}$.

B. — SERUMS A ETUDIER

De provenances très diverses, ils ont été prélevés :

— chez des individus pris au hasard dans une zone d'endémie palustre (VOLLER et BRAY, 1962 ; VOLLER et WILSON, 1964) ou originaires d'une telle région, mais installés récemment en Europe (KUVIN et VOLLER, 1963) ;

— chez des sujets volontaires impaludés expérimentalement par injection de sang parasité par *P. vivax* ou *P. cynomolgi bastianellii*, ou par piquêrre de Moustiques

infectés par ces mêmes espèces de Plasmodiums (KUVIN, TOBIE, COATNEY et leurs collaborateurs, 1962 et 1963) ;

— enfin chez des malades mentaux subissant la malaria-thérapie (COLLINS, JEFFERY et SKINNER, 1964).

Les sérums sont conservés au congélateur à -20° C. Ils ne sont jamais décomplémentés avant d'être étudiés.

C. — CONJUGUE

Du fait de leur commodité d'emploi, les auteurs ont utilisé des conjugués commerciaux.

Il s'agit, le plus souvent, de sérum de cheval anti-gammaglobulines humaines, conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine (fabriqué par la « Sylvana Chemical Company », entre autres).

Mais VOLLER (1964) indique qu'il lui semble obtenir de meilleurs résultats en utilisant comme conjugué du sérum de Chèvre ou de Lapin anti-gammaglobulines humaines.

Dans le but d'augmenter leur spécificité, tous les auteurs soumettent leurs conjugués à un certain nombre d'absorptions :

— par de la poudre desséchée de foie de Souris (VOLLER, 1962) ;

— par de la poudre de foie de Lapin (2 absorptions successives), puis par de la poudre d'os (KUVIN, TOBIE et leurs collaborateurs ; COLLINS et JEFFERY).

La conservation est assurée à $+4^{\circ}$ C après addition de merthiolate à 1/10.000, ou au congélateur à -20° C.

Avant l'utilisation, le conjugué est dilué. La moyenne des dilutions optima correspond généralement à 1/4.

D. — INSTALLATION OPTIQUE

COLLINS¹ et JEFFERY précisent qu'ils utilisent un microscope Zeiss et une lampe Osram HBO 200 avec un filtre UG 2 à l'excitation et un Wratten 2 A comme filtre d'arrêt.

TOBIE (1958) décrit l'installation optique de son laboratoire, qui est composée d'un microscope Leitz-Ortholux et d'une lampe Osram HBO 200. Il utilise surtout un filtre BG 12 à l'excitation et un Wratten 2 A ou 2 B comme filtre d'arrêt.

Les autres auteurs ne mentionnent que les longueurs d'onde employées, qui se situent entre 3.650 et 4.100 Angstroems.

E. — EXECUTION DE LA REACTION

Le mode opératoire varie peu d'un auteur à l'autre. Le principe est le même que pour les autres réactions d'Immuno-fluorescence en méthode indirecte.

a) *Formation du complexe de diagnostic.*

Quelques gouttes de la dilution considérée du sérum à étudier sont déposées sur la lame d'antigène et laissées réagir de 20 minutes (TOBIE et KUVIN, COLLINS) à 40 minutes (VOLLER).

Cette réaction s'effectue toujours en atmosphère humide à la température ambiante et non à 37° C, comme c'est généralement le cas dans les autres applications de l'immuno-fluorescence.

b) *Lavage.*

Les lames sont plongées pendant 15 minutes dans un bain de sérum physiologique tamponné (à pH 7 ou à pH 7,2 suivant les auteurs), renouvelé toutes les 5 minutes.

Elles sont ensuite égouttées.

c) *Formation du complexe révélateur.*

Deux ou trois gouttes de conjugué sont mises à réagir sur les préparations. L'incubation s'effectue à nouveau en atmosphère humide à la température ordinaire, pendant 20 ou 30 minutes.

d) *Nouveau lavage.*

Il s'effectue comme précédemment.

e) Enfin les lames sont couvertes d'une lamelle montée dans une goutte de glycérine tamponnée, et elles sont observées en microscopie ultra-violette.

Les résultats positifs sont exprimés par un nombre variable de croix (de 1 + à 4 +) suivant l'intensité de la fluorescence.

2. — Résultats obtenus

Jusqu'ici les recherches ont essentiellement porté sur la courbe des anticorps spécifiques au cours d'impaludations expérimentales et sur la réponse immunologique lors de paludismes spontanés.

A. — COURBES DES ANTICORPS SPECIFIQUES AU COURS DE PALUDISMES EXPERIMENTAUX

a) VOLONTAIRES NORMAUX IMPALUDÉS PAR *P. vivax*
ET *P. CYNOMOLGI BASTIANELLII*.

— Sur ce sujet, les premiers travaux sont dûs à KUVIN, TOBIE et leurs collaborateurs (mars 1962).

Deux volontaires blancs sont piqués par 13 *Anophèles freeborni* infectés par une souche vénézuélienne de *P. vivax*. Les deux sujets présentent quatorze jours après l'inoculation une parasitémie qui persiste 25 jours chez l'un et 46 jours chez l'autre. Leur sang est collecté à peu près toutes les semaines et conservé jusqu'au moment de la réaction. Quant à l'antigène, il s'agit de sang parasité par *P. vivax*, provenant des malades eux-mêmes ou d'autres patients infectés par la même souche.

L'évolution sérologique est suivie par la méthode indirecte d'Immuno-fluorescence.

Les anticorps spécifiques apparaissent dès les 21^e et 23^e jours (soit 7 à 9 jours après le début de la parasitémie). Leurs titres s'élèvent progressivement jusqu'à des maxima respectifs de 2.560 (au 35^e jour) chez le premier sujet et de 320 (au 28^e jour) chez l'autre. Ces titres restent pratiquement constants pendant 65 jours, contrairement à la parasitémie, qui est très rapidement influencée par la thérapeutique mise en œuvre, de façon volontairement discontinue d'ailleurs. Vers le 66^e jour les courbes commencent à devenir décroissantes. Toutefois les titres sont encore de 40 dans un cas et de 20 dans l'autre au 121^e jour, c'est-à-dire longtemps après la disparition totale de la parasitémie.

— En juillet 1962, TOBIE, KUVIN, CONTACOS, COATNEY et EVANS s'attachent à l'étude de l'évolution des anticorps anti-*Plasmodiums* chez des volontaires infectés avec *P. vivax*

ou avec *P. c. bastianellii*, et la comparent aux variations de la gamma-globulinémie.

L'étude porte sur 9 volontaires dont 4 sont infectés avec *P. vivax* et 5 avec *P. c. bastianellii* (dans tous les cas l'impaludation est réalisée par l'intermédiaire d'*Anophèles freeborni*). Toutes les semaines, on procède à un dosage des gamma-globulines sériques et à un titrage des anticorps spécifiques fluorescents.

L'antigène est constitué par les espèces plasmodiales homologues : sang humain parasité par *P. vivax* pour l'étude des immunsérums anti-*vivax* et sang de singe parasité par *P. c. bastianellii* (le sang des sujets impaludés par ce dernier *Plasmodium* est trop faiblement parasité pour être utilisé comme antigène).

Chez les patients infectés par *P. vivax* les anticorps apparaissent de 15 à 23 jours après l'inoculation. Les titres les plus élevés s'échelonnent de 320 à 5.120. Ils sont obtenus entre le 25^e et le 42^e jour. Chez deux de ces malades la sérologie est encore positive à 1/20 et à 1/40 150 jours après l'inoculation.

En ce qui concerne les malades impaludés avec *P. c. bastianellii*, la courbe des anticorps devient croissante entre le 17^e et le 24^e jour et passe par des sommets allant de 320 à 5.120 entre le 31^e et le 48^e jour. Enfin deux de ces patients donnent des résultats encore positifs à 1/80 après 335 jours.

Quel que soit le type de *Plasmodium* considéré, la courbe des gamma-globulines est toujours parallèle à celle des anticorps spécifiques, et les maxima sont atteints pratiquement au même moment. Ceci tend à montrer l'incidence du paludisme dans l'hypergamma-globulinémie, longtemps mise uniquement sur le compte de facteurs raciaux ou nutritionnels, chez les populations vivant en zone d'endémie palustre.

Ces résultats sont repris et confirmés par la même équipe en 1963, les sérums anti-*P. vivax* et anti-*P. c. bastianellii* réagissant toujours avec l'espèce homologue.

— Par ailleurs, TOBIE et ses collaborateurs (septembre 1962) entreprennent l'étude des RÉACTIONS CROISÉES lors des paludismes expérimentaux à *P. vivax* et *P. c. bastianellii*.

Les sérums de volontaires infectés expérimentalement par l'une de ces deux espèces sont testés avec comme antigène les deux *Plasmodiums* considérés. Dans tous les cas des réactions croisées sont mises en évidence, traduisant la présence d'antigènes de groupe. Il existerait aussi des antigènes propres à chacune des deux espèces. En effet, surtout aux moments des taux maxima de l'évolution sérologique, le titre d'un immunosérum donné est plus élevé s'il est étudié avec le *Plasmodium* homologue. Cette différence est plus nette dans le cas des sérums anti-*P. c. bastianellii* que dans le cas des sérums anti-*P. vivax*.

Ces travaux sont poursuivis par les mêmes auteurs et dans les mêmes conditions l'année suivante.

Les résultats confirment les précédents en ce sens qu'il existe bien des réactions croisées. Mais si le titre des sérums anti-*P. c. bastianellii* est beaucoup plus élevé avec le parasite homologue qu'avec *P. vivax*, il semble que cette fois les titres des sérums anti-*P. vivax* soient sensiblement les mêmes quel que soit l'antigène utilisé.

Au total, les travaux de TOBIE, KUVIN et leurs collaborateurs nous apportent des résultats qui permettent d'envisager de nombreuses applications pratiques.

— Ils confirment et précisent l'existence de réactions croisées entre *P. vivax* et *P. c. bastianellii*, déjà mises en évidence par la méthode directe d'immuno-fluorescence. Par la méthode indirecte, les sérums humains anti-*P. vivax* donnent des titres identiques lorsqu'ils sont étudiés avec l'un ou l'autre de ces *Plasmodiums*. Cette constatation fut pour nous un point de départ pour nos essais d'utilisation de *P. cynomolgi bastianellii* comme antigène pour le séro-diagnostic du paludisme humain.

— En ce qui concerne les paludismes expérimentaux à *P. vivax* ou à *P. c. bastianellii*, les courbes sérologiques obtenues sont d'autant plus significatives qu'elles correspondent à des impaludations qui sont très proches de ce qui peut être observé au cours d'un paludisme « spontané », puisque les expériences portent sur des sujets sains, infectés par l'intermédiaire de l'*Anophèle*.

Ces courbes montrent toutes une réponse sérologique précoce (vers le quinzième jour), des maxima généralement très élevés (aux alentours du trentième jour), puis un tracé « en plateau » pendant une trentaine de jours, enfin une lente décroissance. Les anticorps spécifiques persistent 150 jours pour *P. vivax* et pendant plus de 335 jours pour *P. c. bastianellii*.

b) MALADES MENTAUX SUBISSANT UNE MALARIATHÉRAPIE A *P. MALARIAE* OU A *P. FALCIPARUM*.

Cette étude est réalisée par COLLINS, JEFFERY et SKINNER.

— Au cours d'un premier travail (janvier 1964), ces auteurs étudient la variation des anticorps anti-*Plasmodium* chez 3 malades atteints de syphilis nerveuse et subissant une malariathérapie à *P. malariae*. Ce même *Plasmodium* est utilisé comme antigène pour les réactions d'immuno-fluorescence.

Chaque malade reçoit une INJECTION de sang humain contenant de 4 à 7 millions de parasites.

Avant les inoculations, la recherche d'anticorps spécifiques est chaque fois négative.

Chez les 3 sujets, des parasites, accompagnés d'accès fébriles, sont mis en évidence dans le sang périphérique 10 à 15 jours après l'impaludation.

Le premier malade est traité de façon partielle et présente à quelques semaines d'intervalle deux poussées parasitiques successives. Les anticorps fluorescents sont décelés

à 1/40 une vingtaine de jours après l'inoculation. Par la suite, le titre monte progressivement jusqu'à 640, puis suit la courbe de la parasitémie (la courbe sérologique présente donc elle aussi deux clochers). La réaction d'Immuno-fluorescence est encore positive à 1/320, 275 jours après l'injection des parasites, qui sont toujours retrouvés en petit nombre et par intermittence dans le sang périphérique.

Les deux autres malades ne présentent qu'une seule poussée parasitémique qui disparaît définitivement sous l'influence d'un traitement plus actif (Chloroquine) institué au 40^e jour chez l'un et au 55^e jour chez l'autre. Les anticorps apparaissent entre le 15^e et le 30^e jour (le taux est respectivement de 1/10 et de 1/40). Dans un cas, ce taux se maintient à 1/40 pendant toute la période des accès fébriles et monte progressivement à 1/80 jusqu'au 122^e jour. Puis il diminue peu à peu ; il est encore de 1/20 250 jours après l'inoculation. Dans le deuxième cas, la réaction positive à 1/160 au milieu des accès se maintient à 1/80 durant les quarante jours qui suivent le traitement. Le titre n'est plus que de 10, 170 jours après l'inoculation.

Des contrôles de spécificité sont chaque fois effectués :

— des sérums de syphilitiques non impaludés sont étudiés et restent constamment négatifs ;

— lorsque le titre des sérums des malades observés est bas (1/40), ces sérums sont mis à réagir, dilués au 1/5, avec des lames de sang parasité par *P. vivax* et *P. falciparum*. Les auteurs ne mettent en évidence qu'une fluorescence à peine perceptible qui disparaît à la dilution supérieure des sérums. Il existerait donc une certaine spécificité antigénique de *P. malariae* vis-à-vis de *P. vivax* et de *P. falciparum*.

— Dans une deuxième série de travaux (mars 1964), COLLINS, JEFFERY et SKINNER étudient, selon les mêmes modalités que précédemment, la courbe sérologique de

trois autres malades mentaux, impaludés par une injection intra-veineuse de sang parasité cette fois par une souche colombienne de *P. falciparum* pour l'un, et par une souche thaïlandaise de ce même *Plasmodium* pour les deux autres.

Les antigènes employés pour la recherche des anticorps fluorescents sont constitués par les *Plasmodiums* homologues.

Le premier malade, dont l'étude du sérum non dilué donnait une faible fluorescence le jour de l'inoculation, présente un taux d'anticorps spécifiques maximum à 1/40 dès le deuxième jour après l'apparition de la parasitémie. Un traitement (Chloroquine et Quinine) mis en œuvre entre le 5° et le 30° jour fait disparaître définitivement la parasitémie. Cependant le titre du sérum est toujours de 40 le 303° jour.

Chez les deux autres malades, la réponse immunologique devient perceptible entre le 11° et le 18° jour après l'inoculation. Puis la courbe d'apparition des anticorps présente d'importantes fluctuations (allant de résultats négatifs à des fluorescences nettes pour un taux de 1/80 au maximum). Cette courbe « suit » la courbe de la parasitémie (elle-même influencée par un traitement discontinu), mais avec un certain retard. La sérologie semble constituer une réponse différée aux variations de la parasitémie.

Les auteurs n'obtiennent que de très faibles réactions croisées entre les imunsérums anti-*P. falciparum* et *P. malariae*, tandis qu'aucune fluorescence n'est obtenue avec *P. vivax*.

Ces résultats amènent quelques commentaires.

Tout d'abord, les impaludations sont réalisées par injection et non par l'intermédiaire de l'*Anophèle* comme TOBIE et KUVIN les avaient pratiquées. Ceci explique peut-être les faibles taux qui sont le plus souvent observés, mais qui peuvent résulter aussi de l'emploi d'un conjugué relativement peu actif.

A cette dernière hypothèse seraient liés :

— le fait que les titres sont d'emblée relativement élevés, compte tenu de la valeur assez basse des maxima ;

— les fluctuations importantes observées lors de l'étude sérologique des paludismes à *P. falciparum* au cours desquels la réaction d'immuno-fluorescence a pu se négativer ;

— l'absence de réactions croisées entre *P. falciparum*, *P. malariae* et *P. vivax*. Ce résultat semble a priori incompatible avec les travaux précédents sur les *Plasmodiums* des Primates, et avec nos propres résultats. Les éventuelles réactions croisées entre les trois *Plasmodiums* humains doivent vraisemblablement se situer au-dessus de la limite de sensibilité du conjugué utilisé par les auteurs.

En outre, COLLINS, JEFFERY et SKINNER suggèrent que les faibles taux notés surtout au cours des paludismes à *P. falciparum* expliquent la gravité de cette infection.

Pourtant, de tous les paludismes, la fièvre tierce maligne est celle qui a l'évolution la plus courte en l'absence de traitement. La disparition spontanée relativement rapide des parasites ne s'explique pas si les moyens de défense immunologiques de l'organisme sont réellement aussi faibles. Ou alors il faudrait faire intervenir d'autres hypothèses, que rien pour l'instant ne vient étayer, comme par exemple une adaptation imparfaite de *P. falciparum* au parasitisme de l'homme.

Enfin le parallélisme de la parasitémie et de la sérologie au cours de l'évolution des paludismes expérimentaux à *P. falciparum* laisse supposer que la réponse immunologique dépend plus de la présence des parasites dans le sang périphérique que de la persistance des formes exo-érythrocytaires.

Cette conclusion est contraire à la position de la plupart des malariologues, qui font des formes « intra-viscérales »

le support de la prémunition et évitent pour cette raison de prescrire des gamétocides à des personnes vivant ou devant retourner en zone d'endémie palustre.

B. — REPONSES IMMUNOLOGIQUES A LA SUITE DE PALUDISMES « SPONTANES »

Grâce à la méthode indirecte d'Immuno-fluorescence, les recherches d'anticorps anti-Plasmodiums ont pu être effectuées chez des individus pris au hasard, et vivant dans une zone d'endémie palustre (VOLLER et BRAY 1962, VOLLER et WILSON 1964) ou originaires d'une telle région, mais l'ayant quittée depuis un temps variable (KUVIN et VOLLER 1963).

La première enquête a été pratiquée par VOLLER et BRAY (1962) en Gambie, pays de grande endémie de paludisme à *P. falciparum*.

En utilisant ce Plasmodium comme antigène, l'Immuno-fluorescence a révélé que le taux des anticorps spécifiques est déjà très élevé dans le sang du cordon ombilical prélevé à la naissance. Ce taux baisse au cours des six premiers mois de la vie et demeure faible jusqu'à 30 mois environ. Il se produit alors une montée progressive, puis un tracé « en plateau » atteint vers l'âge de dix ans.

Les sujets qui ont présenté récemment des accès palustres montrent une brusque et considérable augmentation de leurs anticorps qui persistent à un niveau élevé, même après plusieurs années.

Ces premiers résultats ont été récemment complétés (août 1964) par une nouvelle enquête en Gambie de VOLLER et WILSON, qui ont comparé le niveau des anticorps de 2 groupes de jeunes mères et de leurs enfants, âgés de 7 mois 1/2 en moyenne. L'un de ces groupes est soumis à un traitement à la pyriméthanine, l'autre n'est pas protégé.

Chez les sujets traités, on note un titre moyen de 125 pour les mères et de moins de 25 pour les enfants.

Chez les autres, ces taux sont respectivement de 1/385 et de 1/100.

Les auteurs ont conclu que des infections répétées et fréquentes sont nécessaires pour maintenir le taux des anticorps anti-plasmodiums à un niveau élevé.

Ces deux études constituent une première base de départ pour de plus larges enquêtes épidémiologiques. Celles-ci seront d'ailleurs sans doute facilitées par l'utilisation possible pour le séro-diagnostic du paludisme d'échantillons de sang prélevés sur des fragments de papier filtre et desséchés (BRAY 1962).

Plus intéressants sont les travaux de KUVIN et VOLLER (1963) portant sur des sujets qui ont quitté depuis un certain temps une zone d'endémie palustre. Les réactions sont effectuées avec comme antigène aussi bien *P. falciparum* que *P. c. bastianellii*, et démontrent l'existence de réactions croisées entre ces deux hématozoaires. L'étude concerne 26 anciens paludéens âgés de 19 à 46 ans et séjournant à Londres depuis une période de 3 mois à 7 ans. Chez tous, les auteurs notent une persistance des anticorps, bien qu'à un taux relativement bas. Cette première enquête laisse donc supposer que la réponse sérologique est de durée plus longue qu'on ne l'imagine généralement, puisqu'elle serait encore perceptible après 7 ans. Toutefois cette enquête mériterait d'être étendue à un plus grand nombre de cas, car elle touche à quelques-uns des aspects les plus fondamentaux de l'immunologie paludéenne.

Travaux personnels

1. — Essais de mise au point de la méthode indirecte pour le diagnostic immunologique du paludisme

A la lumière des travaux précédents, nous nous sommes efforcé de mettre au point la méthode indirecte de la technique de COONS pour le diagnostic immunologique du paludisme.

A. — ELEMENTS MATERIELS

Nous avons repris pour notre propre compte l'étude expérimentale des différents éléments de la réaction en les adaptant à nos possibilités de travail. Nous envisagerons successivement :

- L'antigène
- Les sérums à étudier
- Le conjugué
- L'installation optique.

ANTIGENE

C'est à propos de l'antigène que se situe surtout la supériorité de l'Immuno-fluorescence sur les méthodes de sérologie classique. En effet, les réactions d'agglutination, de précipitation et de fixation du complément nécessitent toutes l'isolement des Plasmodiums ou éventuellement l'extraction d'un antigène à partir de ces Plasmodiums. Les difficultés quasi insurmontables qui en résultent expliquent, nous l'avons déjà vu, les résultats décevants obtenus par ces techniques.

L'application de la méthode de COONS n'exige quant à elle qu'un simple étalement de sang parasité. Toutefois, l'exécution d'une bonne réaction est si étroitement liée aux qualités de l'antigène que nous avons cru utile de préciser, par de nombreux essais, les meilleures conditions de sa préparation.

1. — ORIGINE.

L'antigène est constitué par un FROTTIS SANGUIN, rapidement séché à l'air, qui doit être réalisé avec un sang *très parasité*. Cette condition nous a conduit à utiliser successivement :

— des échantillons de sang humain parasité par *Plasmodium vivax* ;

— du sang de Souris parasité par *Plasmodium bergheï* ;

— du sang de Singe parasité par *Plasmodium cynomolgi bastianellii*.

a) *Plasmodiums humains*.

Dans un premier temps, nous nous sommes adressé à des *Plasmodiums* humains pour la préparation de l'antigène. Etant donné la rareté du paludisme à Lyon, nous n'avons pu disposer que d'une seule espèce : *Plasmodium vivax*, dont la source était essentiellement constituée par des malades impaludés pour le traitement d'affections psychiatriques diverses à l'Hôpital du Vinatier (Service du Docteur REQUET).

Au début de notre expérimentation, nous effectuions les prélèvements par piqûre au doigt et nous faisions les étalements immédiatement.

Nous nous sommes vite aperçu que ce procédé n'était pas idéal, étant donné le grand nombre de lames nécessaires à nos essais.

Il nous a donc semblé préférable de recueillir le sang sur

anticoagulant, puis de réaliser nos étalements au laboratoire, et non au lit du malade.

Comme *anticoagulant*, nous n'avons utilisé qu'une fois le citrate de sodium, car il nous a semblé altérer la structure de l'antigène.

La défibrination, préconisée par Mlle KRATCHKO dans sa thèse, n'a pas été essayée pour des raisons de commodité.

Nous avons surtout utilisé l'Héparine qui, jusqu'ici, nous a donné toute satisfaction.

Dans la mesure du possible, tous nos prélèvements ont été effectués à l'acmé d'un accès thermique.

Avant de faire les frottis, il est nécessaire de contrôler la parasitémie de chaque échantillon par une coloration de MAY-GRUNWALD-GIEMSA, afin d'éliminer les sangs insuffisamment riches.

En effet, nous avons remarqué que la parasitémie des malades impaludés suivis était très inconstante d'un accès à l'autre : très faible au cours du premier accès (0, 2 ou 4 hématozoaires par lame), elle ne devenait suffisante que vers le cinquième (3 ou 4 hématozoaires par champ microscopique, en lumière ordinaire, avec un objectif $\times 100$ et des oculaires $\times 6$). Cette parasitémie ne fut jamais supérieure à 5 hématozoaires par champ.

Pour la préparation de l'antigène, le seuil de 3 hématozoaires par champ semble vraiment une limite inférieure à ne pas dépasser, sous peine d'allonger considérablement le temps de la « lecture » des réactions. En outre, si un étalement est peu parasité, il devient très difficile d'affirmer la réalité d'une réaction négative.

C'est précisément dans l'espoir de disposer d'un antigène aussi riche que possible en Plasmodiums que nous avons décidé de faire appel à des sangs de divers animaux impaludés.

b) *Plasmodiums animaux.*

Plasmodium bergheï

TOBIE, COATNEY et KUVIN (1961) par la méthode directe, VOLLER (1962) par les méthodes directe et indirecte d'Immuno-fluorescence, ne mirent en évidence aucune réaction immunologique croisée entre *Plasmodium bergheï* et les *Plasmodiums* humains, en particulier *Plasmodium vivax*. La différence immunologique très nette entre ces *Plasmodiums* fut confirmée par P. AMBROISE-THOMAS dans sa thèse.

Disposant au laboratoire d'une souche de *Plasmodium bergheï* entretenue chez des Souris qui, inoculées par voie intra-péritonéale, présentent au bout d'une semaine une parasitémie intense, source « idéale » d'antigène, nous avons voulu vérifier ces précédents travaux par notre technique. Nous avons utilisé plusieurs immunsérums anti-*vivax* de titre élevé ; aucun n'a réagi, même faiblement, avec *Plasmodium bergheï*, qui ne peut donc être utilisé pour le séro-diagnostic du paludisme humain.

Plasmodium cynomolgi bastianellii

Nous avons déjà vu à diverses reprises (travaux de TOBIE, COATNEY et KUVIN ; de VOLLER) que l'Immuno-fluorescence a révélé l'existence de réactions croisées entre *P. vivax* et *P. cynomolgi bastianellii*, parasite isolé en 1959 par GARNHAM chez un Singe *Macaca irus* de Malaisie.

Cette constatation diminue, en toute rigueur, la spécificité de la technique de COONS en ce qui concerne le paludisme humain, encore que *P. c. bastianellii* soit pathogène pour l'homme, comme l'ont rapporté pour la première fois, en 1960, EYLES, COATNEY et GETZ et de nombreux autres auteurs dont J. SCHNEIDER (1961).

Cependant, ces réactions croisées sont susceptibles de faciliter l'utilisation de l'Immuno-fluorescence pour le séro-diagnostic du paludisme humain dans des laboratoires non situés en zone d'endémie palustre qui peuvent alors employer comme antigène *P. c. bastianellii*, dont il semble facile a priori de conserver la souche chez des singes impaludés expérimentalement.

Telle était du moins l'hypothèse de travail avancée par notre Maître J.-P. GARIN, et citée dès juin 1963 dans la thèse de P. AMBROISE-THOMAS.

La valeur de cette hypothèse devait être confirmée à la même date par TOBIE, KUVIN et leurs collaborateurs dans un de leurs travaux que nous avons analysé plus haut.

Dans ce sens, nous avons tenté d'utiliser comme antigène du sang parasité de *Macaca irus cynomolgus* impaludé par nos soins.

Douze inoculations successives ne nous ayant donné que des résultats peu satisfaisants sur lesquels nous reviendrons plus loin (parasitémie nulle ou peu importante), nous avons finalement préparé notre antigène à partir de sang richement parasité de *Macaca mulata* rhésus qui nous a été fourni, additionné d'Héparine, grâce à l'obligeance du Professeur agrégé BENAZET. Ce sang contenait en moyenne 160 millions de Plasmodiums par ml.

Après avoir vérifié la valeur antigénique de *P. cynomolgi bastianellii*, par comparaison à *P. vivax*, pour le séro-diagnostic du paludisme humain, nous avons surtout utilisé ce Plasmodium simien comme antigène pour nos réactions.

2. — PRÉPARATION.

a) *Étalements.*

Réalisés suivant la technique habituelle, les *frottis sanguins* ne nécessitent que des lames microscopiques en verre

ordinaire. Ces lames doivent être d'une propreté rigoureuse et aussi minces que possible.

L'utilisation de la *goutte épaisse* n'est pas satisfaisante à bien des égards.

— Les éléments adhèrent mal à la lame et sont en grande partie décollés lors des différents bains.

— Au cours de la « lecture », on observe une superposition d'images qui rend extrêmement difficile l'identification des Plasmodiums.

Si l'étalement offre l'énorme avantage d'une observation plus rapide et plus sûre, il suppose plusieurs conditions :

— être effectué avec un SANG TRÈS PARASITÉ ;

— être MINCE, d'où la nécessité d'utiliser de toutes petites gouttes de sang distribuées à l'aide d'un petit agitateur en verre, ou mieux à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille à injection intradermique.

La réalisation de l'étalement ne permet pas de siliconer les lames en ménageant la surface du cercle, préa'ablement gravé, dans lequel s'effectue la réaction. C'est là un inconvénient qui entraîne l'obligation d'essuyer les lames après chaque bain dans le sérum tamponné à pH 7,2. Cette opération, longue et fastidieuse, est nécessaire. Sinon, le tampon séchant toujours plus ou moins, le sérum à étudier ou le conjugué ont tendance à « baver » le long de ces dépôts.

b) *Conservation.*

Après un rapide séchage par agitation de quelques instants, les étalements sont placés dans des boîtes porte-lames. La plupart des auteurs conservent ainsi leur antigène à — 70° C (VOLLER, COLLINS et JEFFERY) ou à — 50° C (TOBIE, COATNEY et KUVIN). Nous ne possédions qu'un congélateur à — 20° C, qui semble néanmoins assurer une conservation satisfaisante pendant au moins trois mois.

Ceci augmente la commodité d'emploi de l'Immuno-fluorescence, car il est possible de préparer en une fois un lot important de lames qui serviront pour plusieurs séries de réactions.

c) *Fixation.*

Au moment de l'utilisation, les lames sont sorties du congélateur et laissées sécher à la température ordinaire. (L'utilisation d'un dessiccateur, préconisée par VOLLER en particulier, ne nous semble pas indispensable). Au cours de ce séchage, il est nécessaire de placer les lames indépendamment les unes des autres sur un support horizontal. En effet, sorties du congélateur, les préparations sont recouvertes d'une buée de condensation qui risque de les détriorer si elles sont accolées les unes aux autres, ou si elles ne sont pas disposées horizontalement.

Ce n'est qu'à ce moment que les lames sont gravées. Nous gravons au diamant, du côté de l'étalement, un cercle de 1 cm de diamètre au centre, et un numéro.

— Le cercle sert à repérer la zone où s'effectuera la réaction.

— Le numéro, inscrit toujours dans le même angle, indique non seulement l'ordre de la lame, mais aussi le côté sur lequel a été fait l'étalement.

Les lames sont alors fixées dans un bain d'acétone pendant 30 minutes à -20° C. Ce procédé est utilisé par COLLINS et JEFFERY. Par contre, KUVIN et ses collaborateurs, et VOLLER ne fixent pas leur antigène. Par analogie avec ce qui se fait pour toutes les autres applications de l'Immuno-fluorescence, il nous a semblé souhaitable de soumettre nos préparations à une fixation préalable. La méthode de COLLINS et JEFFERY nous a donné d'emblée entière satisfaction et nous n'avons pas cru utile de tenter, par des essais personnels, de la modifier en faisant varier le fixateur, le temps de fixation ou la température à laquelle celle-ci est réalisée.

d) *Déshémogloblinisation.*

Tous les auteurs sont d'accord sur la nécessité d'éliminer l'hémoglobine, facteur inhibiteur de la fluorescence. A cet effet, nous avons utilisé la technique généralement employée. Après fixation, les lames sont placées dans un bain de HCl à 0,1 % pendant 5 minutes à la température ambiante, puis lavées plusieurs fois dans du sérum tamponné à pH 7,2.

Ainsi préparés, les étalements sont prêts à servir d'antigène pour le séro-diagnostic du paludisme humain par la méthode indirecte de la technique de COONS.

SERUMS A ETUDIER

a) *Prélèvements - Conservation.*

Les prélèvements de sang sont effectués par ponction veineuse. Le sérum est laissé exsuder, puis centrifugé à 4.000 t/mn pendant 5 minutes pour le débarrasser complètement des hématies.

Une fois isolé, il est réparti dans un ou plusieurs tubes à hémolyse bouchés (selon qu'en aura à s'en servir une ou plusieurs fois, puisque certains sérums seront utilisés comme témoins de façon répétée). Ceci permet d'éviter des congélations et des décongélations successives qui font incontestablement perdre au sérum une grande partie de ses propriétés.

Une conservation pratiquement indéfinie est obtenue en plaçant les tubes au congélateur à -20°C .

Pour une durée plus limitée, les sérums peuvent être mis au réfrigérateur à $+4^{\circ}\text{C}$ après addition de 1/10 de leur volume d'azoture de sodium en solution aqueuse à 1 % (procédé mis au point au laboratoire par le Docteur DESPEIGNES pour le test de lyse des toxoplasmes).

Toutes ces manipulations doivent être effectuées aussi stérilement que possible. En pratique, cependant, il ne semble pas qu'une légère contamination bactérienne nuise à la réaction.

b) *Chauffage préalable.*

Pour les réactions d'Immuno-fluorescence, différents auteurs décomplémentent systématiquement leurs sérums par chauffage à 56° C pendant 30 minutes. Cette pratique est très controversée, car elle semble abaisser simultanément le taux des anticorps spécifiques et non spécifiques, si bien que la réaction perd en intensité ce qu'elle pourrait gagner en spécificité.

D'ailleurs, ce procédé ne fut pas utilisé au cours des précédents travaux sur l'immunologie paludéenne par l'Immuno-fluorescence. Nous avons donc étudié nos sérums sans les avoir soumis à un chauffage préalable.

c) *Dilution des sérums.*

Pour une étude quantitative du taux des anticorps, il est nécessaire de tester les sérums à différentes concentrations. Au départ, il faut déjà les porter à une certaine dilution, car nous avons remarqué que presque tous donnent des fluorescences non spécifiques s'ils sont utilisés purs.

Nous avons adopté comme dilution de base le 1/20 ; puis nous avons suivi une progression géométrique de raison 2 pour la suite de nos dilutions.

Pour des raisons de simplicité, le diluant est le même liquide qui sert pour l'ensemble de la réaction : du sérum physiologique tamponné à pH 7,2 ⁽¹⁾.

(1)	Eau bidistillée	1.000 ml	
	Na Cl	6,80 gr	
	PO4 H Na2	1,48 gr	pH 7,2
	PO4 H2 K	0,43 gr	

CONJUGUE

Du fait de leur simplicité d'emploi, nous avons utilisé des produits commercialisés ⁽¹⁾.

Il s'agit de sérums de chèvre anti-gamma-globulines humaines conjugués à de l'isothiocyanate de fluorescéine.

Ces conjugués se présentent sous forme de poudre lyophilisée qui peut se conserver presque indéfiniment au réfrigérateur à $+ 4^{\circ}$ C. Pour l'utilisation cette poudre est remise en suspension dans de l'eau bidistillée. Elle doit alors être stockée au congélateur à $- 20^{\circ}$ C, répartie à raison de 1/2 ml dans plusieurs tubes à hémolyse. Le contenu de chacun des tubes est employé en totalité pour une série de réactions, ce qui permet d'éviter à l'ensemble une succession de congélations et de décongélations.

MODE D'UTILISATION

1. — *Contrôle de spécificité.*

L'animal utilisé pour fabriquer le conjugué possède peut-être dans ses globulines des anticorps spécifiques ou donnant des réactions croisées avec les antigènes malariques. Avant d'employer un nouveau lot de conjugué, il est donc nécessaire de procéder à un contrôle : un étalement antigénique traité par le seul composé fluorescent doit rester sombre. Dans le cas contraire, le conjugué doit être écarté ; son utilisation reviendrait à la méthode directe de la technique de COONS et donnerait des fluorescences identiques quel que soit le sérum étudié.

Au cours de notre expérimentation, cette éventualité ne s'est jamais présentée.

(1) — « Baltimore Biological Laboratories », Baltimore 18, Maryland (U.S.A.), représenté en France par B.D. MÉRIEUX, Marcy-l'Etoile (Rhône). Prix du flacon de 1 ml : 28 F.

— « Microbiological Associates », Bethesda 14, Maryland (U.S.A.), représenté en France par les Etablissements BONNASSIES, 7 bis, rue de Monceau, Paris-8^e. Prix du flacon de 5 ml : 131,76 F.

2. — *Dilution du conjugué.*

La dilution du conjugué tend à augmenter la spécificité de la réaction. Après plusieurs essais, on retient la dilution qui donne le résultat le plus brillant avec un immunsérum de titre élevé et laisse les préparations sombres avec un sérum négatif.

Il s'agit là bien entendu d'une notion relative qui vise à l'obtention d'un compromis aussi satisfaisant que possible, car évidemment aucune dilution ne permet jamais d'obtenir des préparations parfaitement sombres lorsque le sérum étudié est négatif. Théoriquement un tel résultat devrait être accessible. En pratique on parvient toujours à distinguer les parasites.

Cette recherche de la dilution optimale doit être effectuée une fois pour toutes pour chacun des échantillons de conjugué. Il est inutile de la répéter ultérieurement, car le titre du composé fluorescent demeure sensiblement constant (pendant trois mois au moins) après conservation à — 20° C.

Les dilutions que nous avons retenues pour l'ensemble de nos échantillons se situent entre 1/8 et 1/10.

Comme plusieurs auteurs le conseillent, dont NIEL et FRIBOURG-BLANC, nous avons utilisé comme *diluant* une solution dans du tampon pH 7,2 de TWEEN 80 à 1 % qui agit comme mouillant. Cette solution doit être préparée extemporanément, et de son côté, le conjugué doit être dilué juste avant son utilisation.

3. — *Absorption du conjugué.*

Pour augmenter la spécificité du conjugué, un procédé très utilisé consiste en une ou plusieurs absorptions par la poudre d'organes (poudre de foie de Lapin ou de Cobaye, essentiellement).

Les conjugués que nous avons utilisés sont vendus après avoir subi une absorption par de la poudre de foie de Lapin. De nouvelles absorptions par de la poudre de foie de Cobaye

(selon la technique indiquée par P. AMBROISE-THOMAS dans sa thèse) ne nous ont pas semblé augmenter la spécificité, si bien que nous avons rapidement abandonné ce procédé de purification et avons utilisé nos conjugués tels quels, sans absorptions supplémentaires.

4. — *Essai d'augmentation des moyens de contraste.*

Le fluorochrome que nous utilisons, l'isothiocyanate de fluorescéine, provoque une fluorescence jaune-vert des Plasmodiums traités par un sérum positif. Différents éléments de la préparation examinée présentent aussi une telle fluorescence, mais beaucoup moins intense. Si la distinction est facile dans le cas de réaction fortement positive, elle devient extrêmement délicate dans le cas de « sérums douteux » et la spécificité de la technique se trouve ainsi mise en cause.

Nous avons essayé de vaincre cette difficulté par deux procédés :

- La méthode de « double coloration » ;
- L'utilisation d'un conjugué donnant une fluorescence d'une autre couleur que celle de l'auto-fluorescence.

a) *Méthode de « double coloration »*

Cette méthode, en créant un contraste de couleurs, substitue une notion qualitative (différence de coloration entre les éléments spécifiques ou non) à une notion quantitative et dans une large mesure subjective (intensité plus ou moins grande d'une fluorescence dans une couleur donnée).

Au cours de notre expérimentation, nous avons utilisé à cet effet un « colorant immunologique » et deux colorants chimiques.

— « COLORANT IMMUNOLOGIQUE ».

Il s'agit d'albumine de Bœuf conjuguée à de la rhodamine : R.B.A. ⁽¹⁾. Nous basant sur les résultats obtenus à propos de la toxoplasmose par STADTSBAEDER, TELLIER-VERMEYEN et WEBER, nous avons, dans le dernier temps de la réaction, fait agir sur les préparations, le conjugué habituel, mais additionné de 15 % d'une solution pure de R.B.A. ; le reste de la technique demeure inchangé.

Théoriquement, l'albumine de Bœuf, se fixant sur tous les éléments de la préparation, devrait les colorer en rouge orangé grâce à la rhodamine à laquelle elle est conjuguée et masquer leur faible auto-fluorescence jaune-vert. La rhodamine étant un fluorochrome beaucoup moins puissant que l'isothiocyanate de fluorescéine, en cas de réaction positive, la forte fluorescence due à cette dernière substance masque la coloration causée par la rhodamine et fait contraster les éléments spécifiques, qui apparaissent donc jaune-vert brillant, d'avec les autres éléments de la préparation qui restent rouge-orangé.

En pratique, ce procédé appliqué dans nos conditions d'expérimentation n'a pas eu le résultat souhaité. Comme il semble que ce soit classique à propos de parasites d'aussi petite taille que les Plasmodiums, nous n'avons obtenu aucun contraste : c'est-à-dire que la rhodamine n'a entraîné aucune coloration rouge-orangé.

En Parasitologie, les plus belles applications de la méthode de « double coloration » sont dues à SADUN (travaux sur les Bilharzies). Cet auteur a laissé séjourner son antigène, plusieurs jours de suite, dans du liquide fixateur additionné de R.B.A. Un tel procédé permet incontestablement d'obtenir un contraste extrêmement net — du moins en ce qui concerne les Helminthes. Il est malheureusement inapplicable

(1) « Rhodamine Bovine Albumine », fabriquée par « Microbiological Associates ».

pour les Plasmodiums, puisqu'il est impossible de plonger aussi longtemps des étalements de sang dans un liquide quelconque.

— « COLORANTS CHIMIQUES ».

Sur les conseils personnels de SADUN, nous avons utilisé le *Rouge-Congo* et le *Bleu d'Evans*.

D'après les travaux de TEPLITZ et KASS, de l'Institut Mallory de pathologie de l'hôpital de Boston, ces colorants en solution aqueuse, imprégnant tous les éléments de la préparation, diminuent ou suppriment les fluorescences non spécifiques.

Nous avons manipulé selon la technique que NICHOLS et Mc COMB préconisent pour le séro-diagnostic du trachome par l'Immuno-fluorescence. Ces auteurs utilisent des solutions aqueuses de rouge-congo et de bleu d'Evans (de 0,5 % à 2 %). Pour notre part, nous avons fait agir sur un étalement antigénique traité par un immunsérum positif, après l'action du conjugué habituel, mais avant le lavage, des solutions aqueuses de ces deux colorants allant de 0,1 % à 2 % pendant 20 minutes à la température du laboratoire. Comme NICHOLS et Mc COMB, nous avons lavé nos préparations dans du tampon pH 7,2 pendant 5 minutes ; nous les avons rincées dans de l'eau distillée, puis, après séchage complet, nous les avons montées sous lamelle dans de la glycérine tamponnée.

Dans le cas particulier des Plasmodiums, ce procédé ne nous a donné aucun résultat, le contraste entre les complexes immunologiques fluorescents et les autres éléments figurés auto-fluorescents de la préparation ne semblant pas accru.

Nous avons répété la même expérience avec des solutions aqueuses de rouge-congo et de bleu d'Evans à 4 %. Ces colorants ayant des effets détergents, nos lames furent décapées lors du lavage. Pourtant SADUN, à propos des Leishmanias, semble avoir obtenu des résultats valables en utilisant une solution à 0,1 % de bleu d'Evans dans du

tampon phosphate à pH 7,2. Malgré nos essais répétés, nous n'avons personnellement abouti à aucun contraste satisfaisant. Cet échec s'explique sans doute par la composition chimique vraisemblablement différente des colorants utilisés par SADUN et par nous.

b) *Utilisation d'un conjugué donnant une fluorescence d'une couleur autre que celle de l'auto-fluorescence*

La méthode de « double coloration » ne nous donnant pas satisfaction, nous avons tenté d'utiliser un conjugué anti-gamma-globulines humaines dont le fluorochrome est un dérivé de la rhodamine (tétra-méthyl rhodamine) qui permet de repérer aisément les réactions spécifiques par leur coloration rougeâtre.

Nous avons employé un produit commercial ⁽¹⁾ dont la présentation et le mode d'utilisation sont les mêmes que les autres conjugués déjà cités à une seule exception près : la nécessité de le laisser agir plus longtemps (3 ou 4 heures), étant donné que les dérivés de la rhodamine sont beaucoup moins actifs que l'isothiocyanate de fluorescéine.

Ce conjugué a été dilué à 1/2, à 1/4 et à 1/8. Nous l'avons laissé réagir pendant 4 heures, les autres temps de la réaction (durée d'action des sérums étudiés, lavages, etc...) demeurant inchangés. Dans ces conditions nous avons observé, dans les réactions positives, une fluorescence jaune orangé des Plasmodiums relativement facile à distinguer de l'autofluorescence jaune vert. Malheureusement cet avantage était largement contrebalancé par la très faible luminosité de la préparation rendant la mise au point extrêmement délicate.

(1) « Globuline anti-humaine marquée à la tétraméthylrhodamine », fabriquée sous licence B.B.L. par B.D. MÉRIEUX. Prix du flacon de 1 ml : 28 F.

Nous n'avons donc pas retenu les conjugués à la tétraméthyl rhodamine, étant donné :

- l'allongement considérable du temps de manipulation ;
- les difficultés de mise au point et les risques de confusion accrus qui résultent d'une observation malaisée.

INSTALLATION OPTIQUE

A quelques variantes près, nous avons utilisé la même installation optique que P. AMBROISE-THOMAS lorsqu'il mit au point la technique de diagnostic immunologique de la toxoplasmose par l'Immuno-fluorescence.

Le microscope. — Il s'agit d'un microscope standard Zeiss GF 425 muni d'un condensateur à fond noir « humide ». Les observations sont faites à l'objectif à immersion (objectif Zeiss $\times 90$) muni d'un diaphragme à iris qui permet d'obtenir une image de meilleure qualité en augmentant le contraste entre les Plasmodiums et le reste de la préparation.

L'huile à déposer sur le condensateur et sur la lamelle ne doit entraîner aucune auto-fluorescence parasite. Différentes formules ont été proposées entre autres par NIEL et FRIBOURG-BLANC pour le séro-diagnostic de la syphilis ⁽¹⁾. Pour des raisons de commodité, nous avons préféré utiliser une préparation commerciale : l'huile à immersion Zeiss spéciale pour Immuno-fluorescence.

Le microscope est pourvu d'un dispositif binoculaire (Zeiss $\times 12,5$), qui a le gros avantage de permettre une observation commode et peu fatigante. Par contre, il absorbe incontestablement une certaine fraction de lumière et oblige

(1) Formule de NIEL et FRIBOURG BLANC :

Glycol propylénique	7 vol.
Glycol éthylénique	3 vol.
Glycérine	1 vol.
Eau distillée	2 vol.

à travailler dans une pièce parfaitement sombre et après une accommodation suffisante.

Toutefois, en adaptant des œillères en caoutchouc au niveau des oculaires, il est possible de travailler dans une obscurité moins absolue, ce qui est évidemment plus pratique.

La lampe. — Nous utilisons une lampe Osram de 220 volts équipée d'un brûleur à vapeur de mercure sous très haute pression (type HBO 200), qui fournit une brillance extrêmement élevée avec un flux de 9.500 lumens. Ce brûleur est monté dans une cage Zeiss qui assure un refroidissement suffisant.

Les filtres. — La lampe est pourvue d'un filtre anticalorique qui absorbe les radiations rouges et infra-rouges et de quatre filtres d'excitation BG 12 (3 mm), BG 12 (4 mm), UG 2 et UG 5 Zeiss.

Nous avons surtout utilisé les filtres BG 12 (3 et 4 mm).

Les filtres d'arrêt sont placés dans le statif du microscope où ils sont disposés sur deux plateaux superposés. Ce dispositif permet de réaliser différentes combinaisons en fonction du type de fluorochrome utilisé. Les meilleurs résultats nous ont été donnés par les filtres 57 et 43.

Les qualités de sensibilité et surtout de reproductibilité de la réaction dépendent essentiellement des conditions d'utilisation de l'installation optique qui, dans l'étude sérologique du paludisme, prend une importance toute particulière du fait du polymorphisme des Plasmodiums et de leur faible luminosité. Il nous semble donc nécessaire de bien préciser différents détails techniques à propos de la mise au point et de la constance des conditions d'observation.

Mise au point. — Les Plasmodiums présentent généralement une fluorescence assez faible qui se trouve encore diminuée par le grossissement relativement élevé avec lequel on travaille. Il en résulte de très grandes difficultés de « lecture », car les parasites ne deviennent visibles que

lorsque le microscope est pratiquement au point et cessent d'être repérables dès que l'on s'écarte, même très peu, de cette position.

Au départ il faut donc apprécier les qualités de son installation optique à l'aide d'une lame de Plasmodiums rendue très fortement fluorescente par coloration à l'acridine orange ⁽¹⁾.

Par la suite, une mise au point relativement rapide pourra être obtenue dans la mesure où on utilise toujours des lames microscopiques de la même épaisseur et où l'on repère approximativement sur les graduations solidaires de la vis micrométrique la position correspondant à une image nette.

Pour faciliter cette mise au point, nous avons également essayé de procéder en lumière ordinaire après avoir enlevé les filtres. Cette méthode n'est pas valable, le repérage de parasites tels que les Plasmodiums étant alors très difficile, mais cette fois à cause de l'éclairage trop éblouissant. En outre, cet examen avec une lumière trop vive entraîne pour plusieurs minutes une désaccommodation de la vue de l'observateur.

Conditions d'observation. — La spécificité de la technique et, plus particulièrement, la possibilité d'une étude quantitative des sérums paludéens, exigent un éclairage identique

(1) Technique de la coloration à l'acridine orange :

- 1 — Fixer le frottis sanguin 30' à -20° C dans un bain d'acétone.
- 2 — Colorer pendant 20' dans un bain d'acridine orange à 1/10.000 préparé à partir d'une solution aqueuse d'acridine orange à 0,1 % (qui se conserve tout au plus 24 heures) diluée dans du tampon phosphate à pH 6, obtenu de la manière suivante :
 - solution 1 : 9,072 gr de K_2HPO_4 dans 1.000 ml d'eau distillée ;
 - solution 2 : 9,465 gr de Na_2HPO_4 dans 1.000 ml d'eau distillée.Mélanger 230 ml de solution 1 à 40 ml de solution 2.
- 3 — Laver dans du sérum physiologique (il suffit en principe de plonger la lame à 5 ou 6 reprises dans un bain de sérum physiologique).
- 4 — Egoutter la lame et, alors qu'elle est toujours humide, la recouvrir d'une lamelle.
- 5 — Observer en lumière ultra-violette avec un objectif à fort grossissement à sec.

et constant de toutes les préparations pour chaque série de « lectures ». Il est donc nécessaire, au cours de chaque séance, de procéder d'abord à l'examen d'un sérum témoin fortement positif et d'un ou plusieurs sérums négatifs : ils serviront d' « étalons optiques ».

En outre, il faut tenir compte de différents facteurs susceptibles de faire varier l'éclairement. Ce sont essentiellement :

— les brusques variations de tension de courant électrique, qui peuvent être extrêmement gênantes dans bien des cas ;

— la position du condensateur, qui doit être toujours la même pour chacune des lames examinées.

Il est possible d'amener le condensateur au ras de la platine et de le laisser dans cette position pour toute la série de « lectures ». Malheureusement, cette position correspond à un éclairage assez faible. Nous préférons donc procéder de la façon suivante : une goutte d'huile à immersion non fluorescente est déposée sur le condensateur, qui est alors mis au contact de la face inférieure de la lame examinée, puis progressivement abaissé jusqu'à ce que l'éclairement soit maximum (ce résultat est généralement obtenu lorsque le condensateur se trouve à 1 ou 2 mm de sa position de départ). Ce réglage doit être évidemment renouvelé pour chacune des préparations observées. En procédant avec soin, on parvient toutefois à obtenir un éclairement pratiquement constant pour l'ensemble des lames.

B. — TECHNIQUE PROPOSEE

A partir des éléments matériels que nous venons d'étudier, nous avons effectué toutes nos séries de réactions en adoptant la technique suivante :

— Après avoir sorti les lames d'antigène du congélateur,

les laisser sécher 1/4 d'heure environ à la température de la pièce, puis les graver.

— Fixer les étalements dans un bain d'acétone à -20°C pendant 30 minutes.

— Après séchage partiel, déshémoglobiner les hématies dans un bain de HCl à 0,1 % pendant 5 minutes.

— Rincer les lames plusieurs fois dans du sérum physiologique tamponné à pH 7,2 et laisser égoutter aussi complètement que possible en évitant une dessiccation totale qui abîmerait les éléments des préparations.

— A l'aide de la solution à pH 7,2, réaliser les dilutions choisies à partir des sérums à étudier.

— Déposer plusieurs gouttes de chacune de ces dilutions de sérum sur les antigènes correspondants.

— Laisser réagir pendant 20 minutes, à la température du laboratoire ou mieux à 37°C ⁽¹⁾, dans une chambre humide afin d'éviter toute évaporation partielle de la dilution qui, en augmentant la concentration, fausserait le titre du sérum.

— Laver les lames pendant 15 minutes dans un bain de sérum physiologique tamponné à pH 7,2 renouvelé toutes les 5 minutes.

— En évitant toujours la dessiccation complète, les laisser de nouveau égoutter (sans cette précaution, le liquide de lavage restant augmenterait la dilution du conjugué).

— Déposer 2 ou 3 gouttes de conjugué anti-gammaglobulines humaines sur chaque préparation.

— Laisser réagir pendant 20 minutes, à 37°C , en chambre humide.

(1) Les autres auteurs laissent réagir à la température ordinaire, et non à l'étuve à 37°C . Cette dernière température nous semble pourtant donner des résultats un peu plus nets.

— Laver les lames comme précédemment et les laisser égoutter.

— Recouvrir chaque préparation d'une lamelle montée sur une goutte de glycérine tamponnée à pH 7,2 ⁽¹⁾.

TÉMOINS

Il est nécessaire de prévoir pour chaque série de lectures :

— un témoin fortement positif donnant une fluorescence de grande intensité.

Ce témoin sert d' « étalon optique », c'est-à-dire qu'il permet de juger de l'installation microscopique en même temps qu'il assure une meilleure reproductibilité de la réaction en constituant une fluorescence « de référence » d'une série à l'autre ;

— un témoin négatif au moins ⁽²⁾.

LECTURE

Etant donné l'important polymorphisme des Plasmodiums, il est quelquefois très difficile d'identifier ces parasites parmi les différents éléments qui brillent dans une préparation même très riche.

Les réactions fortement positives sont aisées à reconnaître ; par contre, il est difficile de se prononcer en cas de réactions douteuses, ou même pour les réactions négatives lorsqu'un élément équivoque est aperçu. La « lecture » nécessite donc alors l'examen soigneux de la totalité de la préparation, ainsi qu'une certaine habitude de la microscopie en fluorescence.

(1) — 9 volumes de glycérine

— 1 volume de soluté isotonique à pH 7,2

(2) Pour éviter toute cause d'erreur, nous avons utilisé comme témoins négatifs des sérums provenant d'enfants de moins de 2 ans nés en métropole et en l'ayant jamais quittée,

Il faut surtout tenir compte :

— de la taille de l'élément observé ;

— de l'intensité de sa fluorescence qui, même très nette, n'est jamais comparable à la luminosité des noyaux des leucocytes ou, a fortiori, à celle des dépôts de fluorescéine ayant résisté au lavage ;

— enfin de sa situation intra-érythrocytaire.

Il est malgré tout quelquefois malaisé d'affirmer le diagnostic ; aussi, nous sommes-nous basé sur la comparaison des lames douteuses avec les témoins négatifs.

En outre, un principe formel de nos « lectures » a été que l'observateur ne puisse soupçonner les résultats. Pour cela, nous avons systématiquement travaillé à deux, les lames étant passées à l'observateur dans un ordre tel qu'il ne puisse en deviner la nature. En utilisant, pour chaque série, un grand nombre de lames, nous sommes arrivé à éliminer presque totalement l'important facteur subjectif, et nous avons pu obtenir des résultats corrects. Dans quelques cas cependant, c'est seulement le passage à la dilution supérieure du sérum étudié qui nous a permis de lever le doute.

Dans ces conditions, il est évidemment difficile de chiffrer valablement les résultats. Pour des raisons de commodité, nous nous sommes toutefois conformé à la notation habituelle en croix (de + à +++) suivant que la fluorescence est faiblement, modérément, ou fortement intense par rapport aux témoins positifs de référence.

2. — Résultats personnels

Nous envisagerons successivement les résultats obtenus à propos :

— de plusieurs essais d'impaludation de singes *Macaca irus cynomolgus* par *Plasmodium cynomolgi bastianellii*. Nous cherchions alors à disposer à Lyon de sangs richement parasités et utilisables pour le séro-diagnostic du paludisme humain ;

— de la détermination *quantitative* des réactions croisées entre *Plasmodium vivax* et *Plasmodium cynomolgi bastianellii* traités par les immunsérums correspondants à l'une ou l'autre de ces espèces plasmodiales ;

— de l'évolution sérologique de malades soumis à une malariathérapie à *P. vivax* ;

— enfin, du titrage des anticorps « anti-*Plasmodiums* » chez des sujets présentant ou ayant présenté un paludisme « spontané ».

A. — TENTATIVES D'IMPALUDATION DE SINGES *MACACA IRUS CYNOMOLGUS*

La bonne réalisation du séro-diagnostic du paludisme par la méthode de COONS est, nous l'avons déjà vu, subordonnée à l'utilisation, comme antigène, d'étalements sanguins très parasités.

Devant les difficultés que nous avons rencontrées à nous procurer des sangs humains suffisamment infectés par *P. vivax* pour la préparation d'un antigène convenable, nous avons pensé nous adresser à *P. c. bastianellii*, puisque ce *Plasmodium* simien présente avec *P. vivax* des réactions croisées, signalées à diverses reprises par TOBIE, KUVIN et VOLLER.

Dans l'espoir de posséder localement une « source » de *P. c. bastianellii*, nous avons tenté d'impaluder douze singes

Macaca irus cynomolgus mis à notre disposition grâce à l'obligeance de MM. les docteurs MÉRIEUX, que nous tenons à remercier ici.

a) PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.

Notre souche de *P. c. bastianellii* était constituée par du sang hépariné de *Macaca mulata* rhésus contenant environ 150 millions de parasites par ml, soit 3 hématies parasitées p. 100. Ce sang provenait des Laboratoires Rhône-Poulenc, et nous le devons à la très grande amabilité du Professeur agrégé BENAZET.

Nous avons réalisé les douze tentatives d'impaludation en deux séries successives.

Les singes ont été quotidiennement suivis du point de vue clinique (courbe de température en particulier) et deux fois par semaine du point de vue parasitémie.

Voici rapidement résumées leurs observations ⁽¹⁾.

Première série

— Singe S1 (4 200 g),

Singe S2 (3 500 g) :

Inoculation le 17-1-64 par injection intra-veineuse de 3 ml de sang de rhésus contenant approximativement 450 millions de *P. c. bastianellii*.

Ces animaux sont suivis pendant 30 jours au cours desquels ils ne présentent ni épisode fébrile ni parasitémie décelable.

— Singe S3 (3 000 g) :

Inoculation le 7-2-64 par injection intra-veineuse de 3 ml de sang de S1 prélevés au 21^e jour.

Pendant 33 jours cet animal présente une courbe thermique stable.

Aucun parasite n'est mis en évidence dans le sang périphérique.

— Singe S4 (4 000 g) :

Inoculé dans les mêmes conditions que S3 il meurt accidentellement le lendemain (8-2-64).

(1) Nous remercions le Docteur VICARIA qui nous a fait bénéficier de son expérience et a bien voulu superviser l'évolution des animaux impaludés à la singerie de l'Institut MÉRIEUX (Marcy-l'Etoile).

Deuxième série

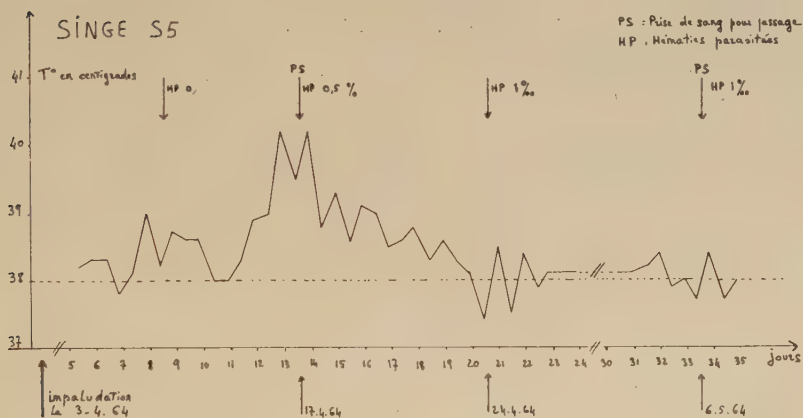
Après ce premier échec, nous avons repris nos essais en infectant deux autres cynomolgus (S5 et S6) avec un nouvel échantillon de sang de rhésus parasité par *P. c. bastianellii*.

A partir du sang de S5, nous avons inoculé six animaux (de S7 à S12) en variant les voies d'injection (intra-veineuse, intra-musculaire ou intra-péritonéale).

— Singe S5 (3 500 g) :

Inoculation le 3-4-64 par voie intra-veineuse avec 3 ml de sang de rhésus contenant environ 450 millions de parasites.

L'évolution thermique et parasitémique est résumée par la courbe ci-dessous.



— Singe S6 (2 900 g) :

Infecté à la même date et dans les mêmes conditions que S5, il est observé pendant 114 jours. Echec de l'impaludation.

— Singe S7 (1 500 g) :

Première inoculation le 17-4-64 par voie intra-musculaire avec 2 ml de sang de S5, prélevés au 15^e jour, contenant environ 50 millions de Plasmodiums. Aucun résultat.

Réinoculation le 6-5-64 par voie intra-péritonéale avec 2,5 ml de sang de S5, prélevés au 34^e jour, contenant environ 15 millions de Plasmodiums. Echec de l'impaludation.

— Singe S8 (2 400 g) :

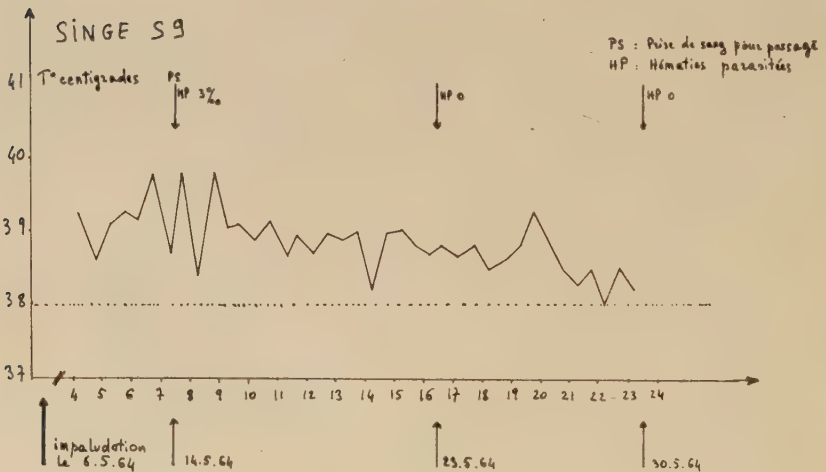
Première inoculation le 17-4-64 par voie intra-veineuse avec 1,5 ml de sang de S5, prélevé au 15^e jour, contenant environ 37 millions de Plasmodiums. Aucune réaction thermique ni parasitémique.

Réinoculation le 6-5-64 dans les mêmes conditions que S7, sans plus de résultats.

— Singe S9 (2 500 g) :

Inoculation le 6-5-64 par voie intra-veineuse avec 2 ml de sang de S5, prélevés au 34^e jour, contenant environ 10 millions de Plasmodiums.

Impaludation positive comme le montre la courbe ci-dessous.

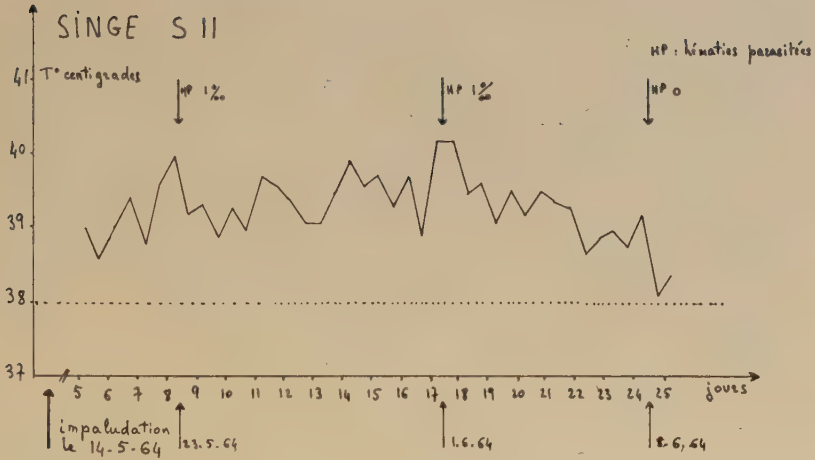


— Singe S10 (2 500 g) :

Inoculation le 6-5-64 dans les mêmes conditions que S9.
Echec de l'impaludation.

— Singe S11 (1 800 g) :

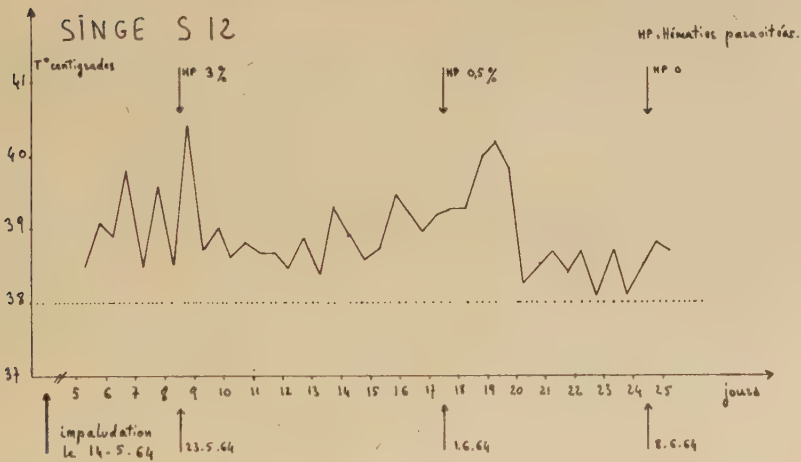
Inoculation le 14-5-64 par voie intra-veineuse avec 3,5 ml de sang de S9 prélevés au 8^e jour, contenant environ 50 millions de Plasmodiums.
Impaludation réussie.



— Singe S12 (2 500 g) :

Inoculation le 14-5-64 dans les mêmes conditions que S11.

Infestation également réussie.



b) RÉSULTATS.

— *Inoculations par injection intra-veineuse de sang de Macaca mulata rhésus.*

Le nombre de *P. c. bastianelli* injectés était chaque fois très élevé (450 millions environ). Pourtant, des quatre *Macaca irus cynomolgus* inoculés, S1, S2, S5 et S6, un seul (S5) a présenté deux accès fébriles accompagnés d'une faible parasitémie (0,5 % d'hématies parasitées au maximum).

— *Sub-passages en série.*

Tous les essais réalisés par voie intra-musculaire et intrapéritonéale ont été négatifs, contrairement à ce qui est observé pour *P. vivax* et *P. bergheï*.

En ce qui concerne les inoculations par voie intra-veineuse, nous avons retrouvé quelques *Plasmodiums* sur des frottis sanguins effectués à partir de S9, S11 et S12, qui tous avaient reçu du sang de S5.

En somme, seulement quatre inoculations ont été suivies d'un petit nombre d'accès thermiques (3 au maximum) et d'une parasitémie modérée et transitoire.

Ceci correspond aux résultats obtenus par le Professeur agrégé BENAZET au cours d'un essai d'impaludation d'une dizaine de *Macaca irus cynomolgus* (communication personnelle). Par contre, d'après le même auteur, l'injection de 1 million de *P. c. bastianelli* à des *Macaca mulata rhésus* suffit pour entraîner, chez ceux-ci, une parasitémie intense (que BASU chiffre à 17 ou 18 % d'hématies parasitées) apparaissant le 7^e jour et durant de 15 jours à 2 mois.

c) COMMENTAIRES ET DISCUSSION.

Devant les échecs complets ou partiels auxquels nous avons abouti, différentes hypothèses peuvent être avancées.

— Une *spécificité* assez stricte de *P. c. bastianellii* pour *Macaca mulata* rhésus expliquerait la rareté des accès et la faible parasitémie lorsque l'impaludation de *Macaca irus* cynomolgus est positive. Mais il ne faut pas surestimer cette notion de spécificité, puisque c'est chez un *Macaca irus* de Malaisie que *P. c. bastianellii* a été isolé pour la première fois par GARNHAM en 1959. En outre, les tentatives d'impaludation de *Macaca mulata* rhésus ne sont pas elles non plus toujours suivies de succès.

— L'*origine géographique* de nos animaux d'expérience pourrait être également mise en cause. Les singes utilisés par le Professeur agrégé BENAZET proviennent d'Indonésie (Sumatra). Ils semblent beaucoup plus réceptifs que les nôtres qui sont originaires d'Afrique. La différence de sensibilité s'expliquerait alors par tout ce qui est lié à des provenances géographiques aussi dissemblables (facteurs nutritionnels, endémies trypanosomiennes africaines génératrices d'hyper-gamma-globulinémie, etc...) ou par le fait que l'endémie palustre est sans doute plus importante en Afrique. Nous rejoignons là la troisième hypothèse concernant nos échecs :

— l'existence d'une PRÉMUNITION due à un paludisme spontané antérieur à l'arrivée en France et rendant nos animaux partiellement réfractaires à une nouvelle impaludation.

C'est ce que nous avons tenté de vérifier par l'Immuno-fluorescence en procédant à des *recherches d'anticorps chez des singes* du même élevage.

Pour entreprendre une telle étude, il nous semblait théoriquement indispensable de disposer d'un composé fluorescent anti-gamma-globulines de singe. Nous n'avons pu nous en procurer, et c'est alors que nous avons imaginé de recourir à nos conjugués commerciaux anti-gamma-globulines humaines. Ces produits se sont montrés parfaitement valables pour l'étude de 5 sérums simiens pris chacun à

six dilutions différentes et réagissant avec *P. c. bastianellii* et avec *P. vivax*.

Il ne s'agit là bien sûr que de premiers résultats qui ne sauraient apporter d'arguments formels. Il semble toutefois que *les gamma-globulines de l'homme sont très proches de celles du singe*. C'est du moins la conclusion à laquelle nous sommes arrivé expérimentalement. Elle rejoint celle de NIEL, FRIBOURG-BLANC et MOLLARET dans un travail dont nous n'avons eu connaissance qu'après nos propres essais.

Si cette similitude des gamma-globulines de l'homme et du singe se trouvait confirmée, elle pourrait faciliter le séro-diagnostic du paludisme simien, puisque ce sont surtout les conjugués anti-gamma-globulines humaines que l'on trouve couramment dans le commerce. Il serait possible, alors, de suivre du point de vue sérologique les effets chez l'animal d'un traitement anti-palustre, en particulier en ce qui concerne les médicaments gaméticides actifs sur les formes viscérales.

Notre étude a porté sur :

— les sérums des deux premiers singes inoculés S1 et S2. Leur sang avait été prélevé alors pour le cas où nous aurions pu disposer de conjugué anti-gamma-globulines simiennes que nous croyions indispensable ;

— les sérums de trois singes (S13, S14, S15) pris au hasard dans la même animalerie et capturés dans la même région d'Afrique. Ces animaux n'avaient jamais subi d'essai d'impaludation.

Pour ces 5 sérums, nous avons utilisé la technique déjà indiquée pour le séro-diagnostic du paludisme humain. L'antigène était constitué par des étalements de sang de singe riches en *P. c. bastianellii* et par des lames de sang humain parasité par *P. vivax*.

Des témoins constitués par des lames d'antigènes traitées par le seul conjugué sont tous restés « sombres ».

TABLEAU DES RÉSULTATS

Sérums		S 1		S 2		S 13		S 14		S 15	
Taux	Antigène	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V
1/20		+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	++	+
1/40		++	+	++	++	+	+	++	++	++	+
1/80		++	+	++	+	—	—	+	+	—	—
1/160		++	+	++	+			—	—		
1/320		+	+	+	+						
1/640		—	—	—	—						

C : *Plasmodium cynomolgi bastianellii*.

V : *Plasmodium vivax*.

— Notons tout d'abord que l'existence de réactions croisées entre *P. vivax* (V) et *P. cynomolgi bastianellii* (C) se trouve confirmée par l'étude de ces sérums qui tous donnent les mêmes titres avec ces deux *Plasmodiums*.

Mais ces résultats indiquent surtout que nos échecs semblent bien devoir être mis sur le compte d'une PRÉMUNITION des animaux.

En effet, les sérums S1 et S2 prélevés au 6^e jour chez des singes qui, après inoculation, n'ont présenté ni accès thermique, ni parasitémie décelable, sont positifs à 1/320.

Les sérums S13, S14, S15, pris à dessein au hasard, sont tous positifs à 1/40 ou à 1/80.

Tout se passe donc comme si la grande majorité des animaux de l'élevage considéré possédait un certain taux d'anticorps. Dans ces conditions, les tentatives d'impaludation avaient toutes les chances, chez les singes prémunis, de se solder par un échec, même en inoculant un nombre

considérable de parasites (jusqu'à 450 millions de schizontes), alors que chez les singes ne possédant aucun anticorps, 1 million de parasites suffit.

Il est possible que cette barrière immunologique soit franchie lorsque l'infestation est réalisée par l'Anophèle. On peut supposer en effet que la structure antigénique des sporozoïtes est très différente de celles des Plasmodiums développés dans les cellules hépatiques, au cours du cycle exo-érythrocytaire, ou dans les hématies. Cette différence de virulence peut être rapprochée des modes de reproduction respectifs de ces formes : multiplication sexuée (gamogonie) pour les sporozoïtes, reproduction schizogonique asexuée des formes évolutives parasites de l'homme.

B. — ETUDE COMPAREE D'IMMUNSERUMS HUMAINS ANTI-VIVAX REAGISSANT AVEC PLASMODIUM CYNOMOLGI BASTIANELLII ET PLASMODIUM VIVAX COMME ANTIGENES.

Dès le départ, notre idée directrice, étant donné les conditions matérielles locales, a été l'utilisation de *P. c. bastianellii* pour le séro-diagnostic du paludisme humain.

Il nous a donc semblé fondamental de revenir sur l'étude de sérums humains anti-vivax testés simultanément par *P. c. bastianellii* et *P. vivax* et de nous assurer que leurs *titres* étaient bien identiques avec l'un ou l'autre antigène.

Cette identité avait bien sûr été signalée par d'autres auteurs qui n'avaient pas toutefois les mêmes raisons que nous de s'y attacher davantage, puisqu'ils disposaient de « réservoirs » abondants et réguliers d'hématozoaires humains.

Nous avons étudié dix sérums de paludéens et trois sérums témoins constamment négatifs.

Nous avons rassemblé les *résultats* dans le tableau ci-contre.

REACTIONS CROISEES ENTRE PLASMODIUM VIVAX ET PLASMODIUM CYNOMOLGI BASTIANELLII

Sérums	T 1		T 2		T 3		1 d		2 a		2 c		2 d		3 a		3 b		12 a		12 b		13 a		13 b	
Antigène aux	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V
1/20	—	—	—	—	—	—	++	++	—	—	++	++	++	++	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1/40	—	—	—	—	—	—	++	++	—	—	++	++	++	++	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1/80							+	+			+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/160							+	+			+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/320							+	+			—	—	+	+			+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
1/640							—	—					—	—							—	—	—	—	—	—

T : Sérums témoins

C : Plasmodium cynomolgi bastianellii

V : Plasmodium vivax

Le numérotage des sérums correspond à celui que nous avons adopté dans la suite de l'exposé des résultats : le chiffre indique le numéro de l'observation ; la lettre, la place éventuelle du sérum dans l'évolution sérologique.

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

On note dans tous les cas une parfaite concordance dans les deux séries de résultats.

Mais les lames de *P. c. bastianellii* sont beaucoup plus faciles à lire que les étalements de sang humain, car elles sont plus richement parasitées. Cela conditionne non seulement la rapidité, mais aussi la sûreté des « lectures ». En effet, nous avons noté à plusieurs reprises la présence sur des lames d'antigène de quelques éléments fluorescents pouvant être confondus avec des *Plasmodiums*. En pratique, le doute est rapidement levé en comparant la densité de ces éléments à celle des hématies parasitées. Cette comparaison est d'autant plus valable que la parasitémie est intense.

Pour toutes ces raisons, nous avons utilisé comme antigène du sang de singe parasité par *P. c. bastianellii* pour la réalisation de toutes nos réactions ultérieures.

C. — EVOLUTION SEROLOGIQUE DE PALUDISMES EXPERIMENTAUX A *PLASMODIUM VIVAX*

Pour suivre l'évolution sérologique du paludisme, il est nécessaire que la date de l'infestation puisse être précisée. Ceci n'est possible que lors d'une impaludation volontaire.

Aussi, avons-nous étudié, à l'aide de notre technique d'Immuno-fluorescence, les sérums de malades subissant la malarithérapie à *P. vivax*

— à l'Hôpital Psychiatrique du Vinatier (Service du Docteur REQUET) pour le traitement de maladies mentales.

Nous avons personnellement suivi l'évolution clinique, parasitémique et sérologique de ces patients ;

— à la Clinique des Maladies Infectieuses (Service du Professeur BERTOYE) pour le traitement de maladie de BUERGER. Nous recevions régulièrement le sérum de ces malades dont nous avons pu consulter les observations cliniques.

Nous tenons à remercier à nouveau M. le Professeur BERTOYE et M. le Docteur REQUET de leur obligeance.

Tous les sujets ont été inoculés par INJECTION INTRAMUSCULAIRE de 10 ml de sang hépariné contenant de 300 à 600 millions de parasites. Ce sang était lui-même prélevé chez d'autres impaludés en accès.

Au total, notre étude a porté sur 12 malades.

Nous les répartirons en deux groupes.

— Ceux dont l'impaludation a été suivie de succès. Pour ces 10 malades, nous avons pu, dans 5 cas, suivre la sérologie dès l'inoculation. Pour les autres, nous n'avons étudié qu'un seul sérum.

— Les sujets réfractaires à une nouvelle tentative d'impaludation.

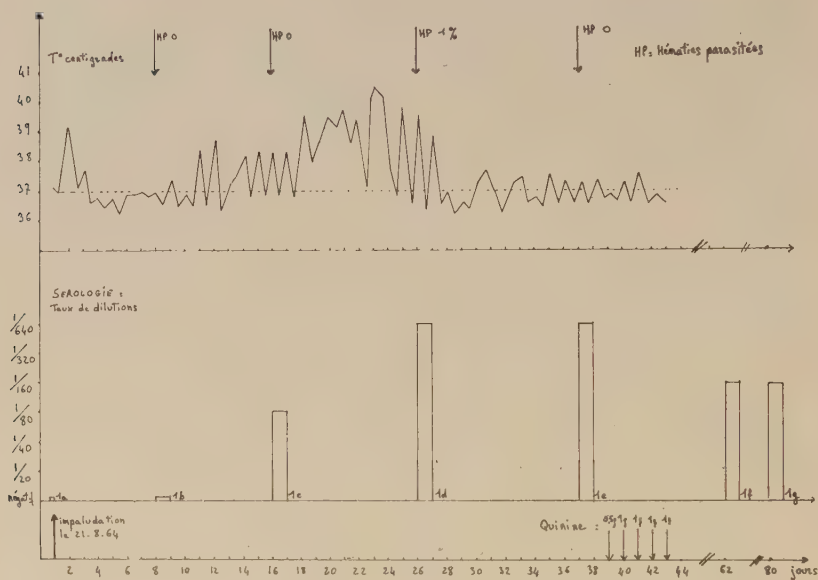
a) *Premier groupe*

Les 9 premiers sujets ont été impaludés pour le traitement d'affections psychiatriques diverses. Aucun d'entre eux ne présentait d'antécédents palustres.

La dixième observation concerne un artéritique d'origine nord-africaine.

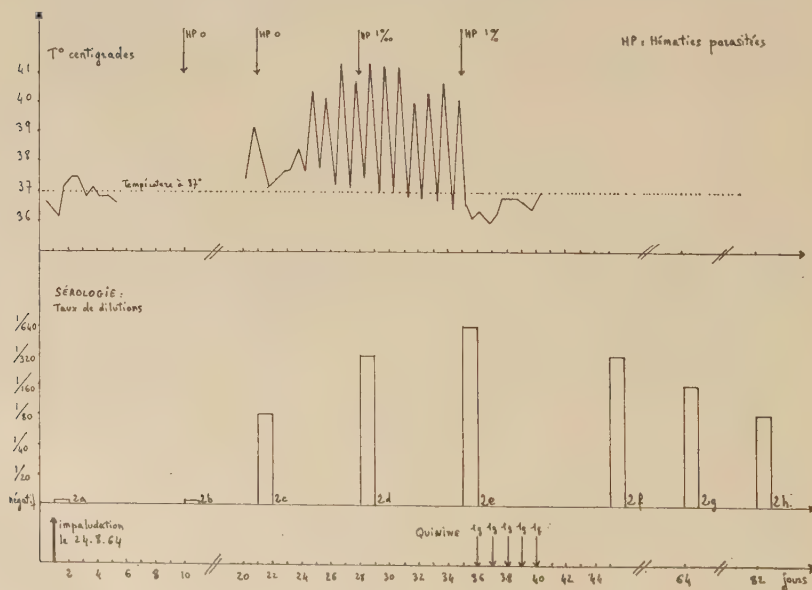
— OBSERVATION N° 1 (Service du Docteur REQUET) :

M. BER..., 41 ans. Impaludé le 21-8-64.



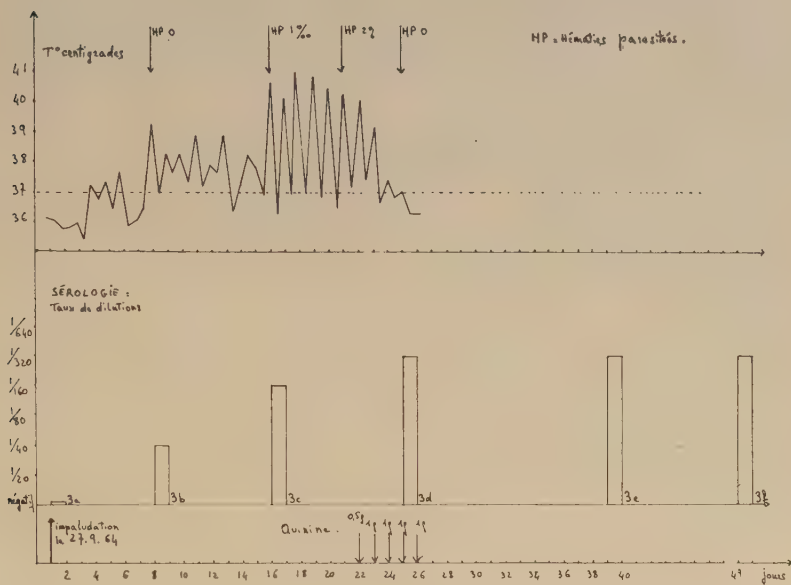
— OBSERVATION N° 2 (Service du Docteur REQUET) :

M. REG..., 44 ans. Impaludé le 24-8-64.



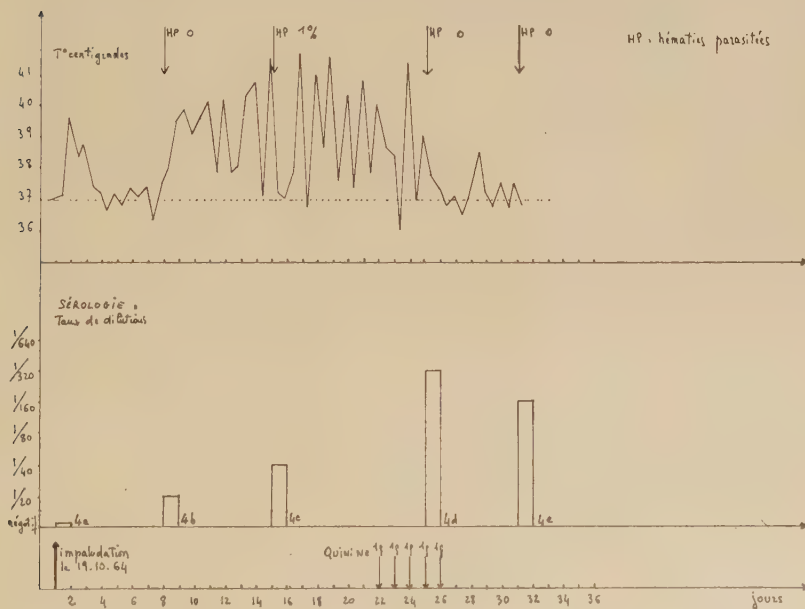
— OBSERVATION N° 3 (Service du Docteur REQUET) :

M. FAB..., 44 ans. Impaludé le 27-9-64.



— OBSERVATION N° 4 (Service du Docteur REQUET) :

M. JOL..., 50 ans. Impaludé le 19-10-64.

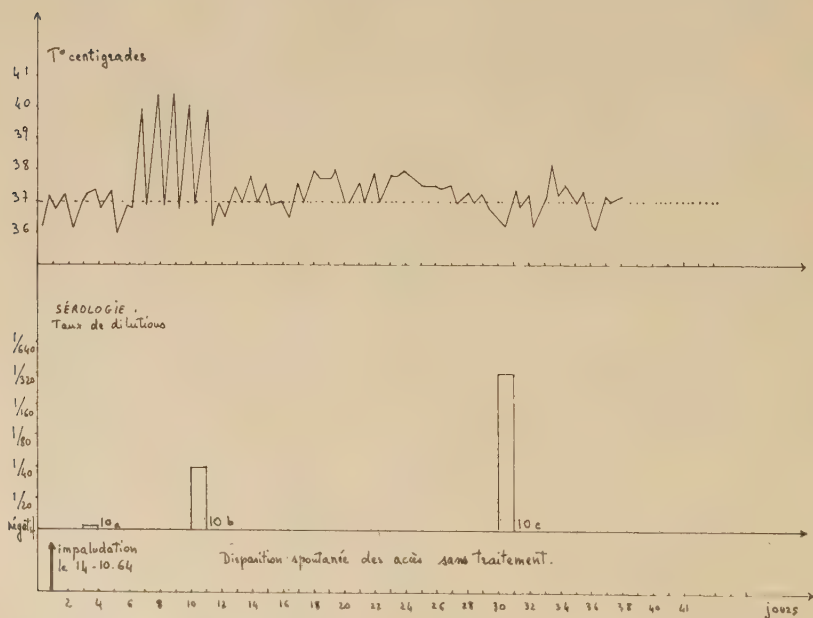


Les réactions d'Immuno-fluorescence réalisées avec le sérum de différents malades impaludés dont nous n'avons pu suivre la totalité de l'évolution, sont résumées dans le tableau suivant :

Observations (Service du Dr. REQUET)	Dates de l'examen sérologique par rapport à l'inoculation	Taux des anticorps
N° 5 M. DUV...	27° jour	1/160
N° 6 M. ROU...	54° jour	1/160
N° 7 M. GIL...	80° jour	1/80
N° 8 a M. DUC...	395° jour	1/40
N° 9 M. BAV...	20 ans	0

— OBSERVATION N° 10 (Clinique des Maladies Infectieuses. 23 130):

M. REH..., 35 ans. Impaludé le 14-10-64.

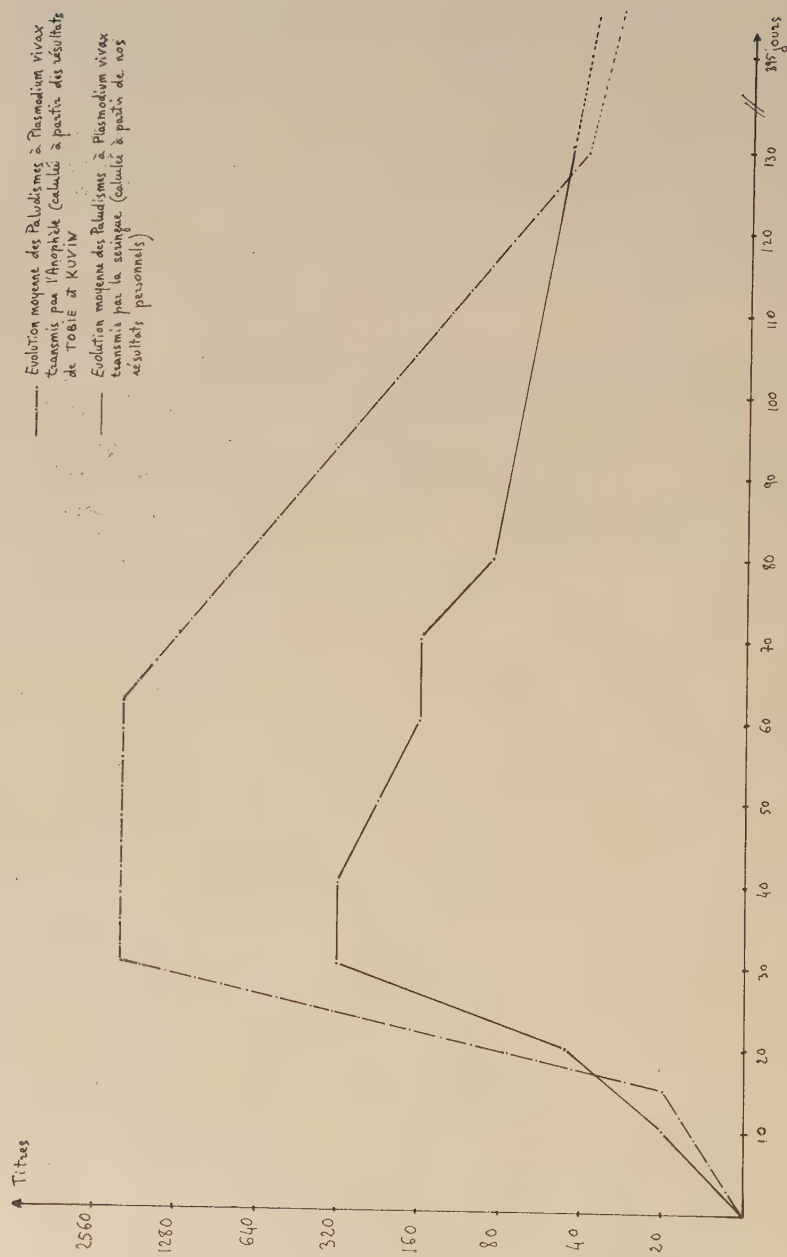


Ce malade est inoculé sans beaucoup d'espoir de succès pour le traitement d'une thrombo-angéite de BUEGER. En effet, le sujet d'origine nord-africaine, difficile à interroger, prétendait avoir récemment présenté des accès fébriles en Algérie.

Contrairement à ce que nous pouvions penser, l'impaludation thérapeutique réussit. Les anticorps ne sont apparus qu'après le premier épisode fébrile. Le malade s'est comporté comme s'il était exempt de paludisme auparavant.

Nous pouvons donc rejeter la notion d'antécédents palustres surtout récents chez ce sujet.

Les résultats des différents examens sérologiques de tous ces sujets sont groupés dans la *courbe moyenne* ci-après. Les points de cette courbe générale ont été calculés en faisant la moyenne arithmétique des titres obtenus pendant des intervalles de temps de dix jours (du 5^e au 15^e jour, du 15^e au 25^e jour, etc...).



COURBES MOYENNES DE L'ÉVOLUTION SÉROLOGIQUE DE PALUDISMES EXPÉRIMENTAUX
A PLASMODIUM VIVAX

COMMENTAIRES

Cette courbe nous fournit une première idée de l'évolution sérologique des paludismes expérimentaux à *P. vivax* à la suite d'une inoculation intra-musculaire.

Il nous paraît surtout intéressant de l'étudier par comparaison avec les résultats observés par TOBIE et KUVIN pour les paludismes expérimentaux à *P. vivax*, transmis par *l'Anophèle*. Parallèlement à la nôtre, nous avons donc tracé une courbe moyenne obtenue à partir des différents travaux de ces auteurs.

— *Dates d'apparition des anticorps*. — Le taux moyen de 1/40 est obtenu plus précocement chez nos malades (dès le 10^e jour au lieu du 15^e jour pour TOBIE, KUVIN et COATNEY). En outre, dans notre étude, la réponse sérologique précède toujours la parasitémie.

— *Taux maxima*. — Ils sont atteints, dans les deux cas, vers le trentième jour. Toutefois, nos titres sont beaucoup plus faibles (320 au lieu de 2.560). Cette différence est trop accusée pour pouvoir être mise uniquement sur le compte d'une variation de l'activité des conjugués utilisés.

Par ailleurs notre courbe montre un plateau de 10 jours seulement, au lieu de 30 pour les auteurs américains. Ceci correspond d'ailleurs, du point de vue immunologique, aux différences cliniques et parasitémiques qui séparent le paludisme par injection intra-musculaire de l'impaludation par le moustique : petit nombre d'accès thermiques, disparaissant souvent de manière spontanée, parasitémie modérée et fugace.

— *Persistance de la réponse immunologique*. — Par contre, les deux types de paludismes expérimentaux semblent entraîner des taux équivalents d'anticorps durant des périodes sensiblement comparables.

Enfin il convient de remarquer que le traitement (1 g de Quinine per os pendant 5 jours consécutifs) ne semble pas influencer sur l'évolution sérologique.

b) Deuxième groupe

— OBSERVATION N° 11 (Clinique des Maladies Infectieuses. 23 028):

M. SCHL..., 39 ans.

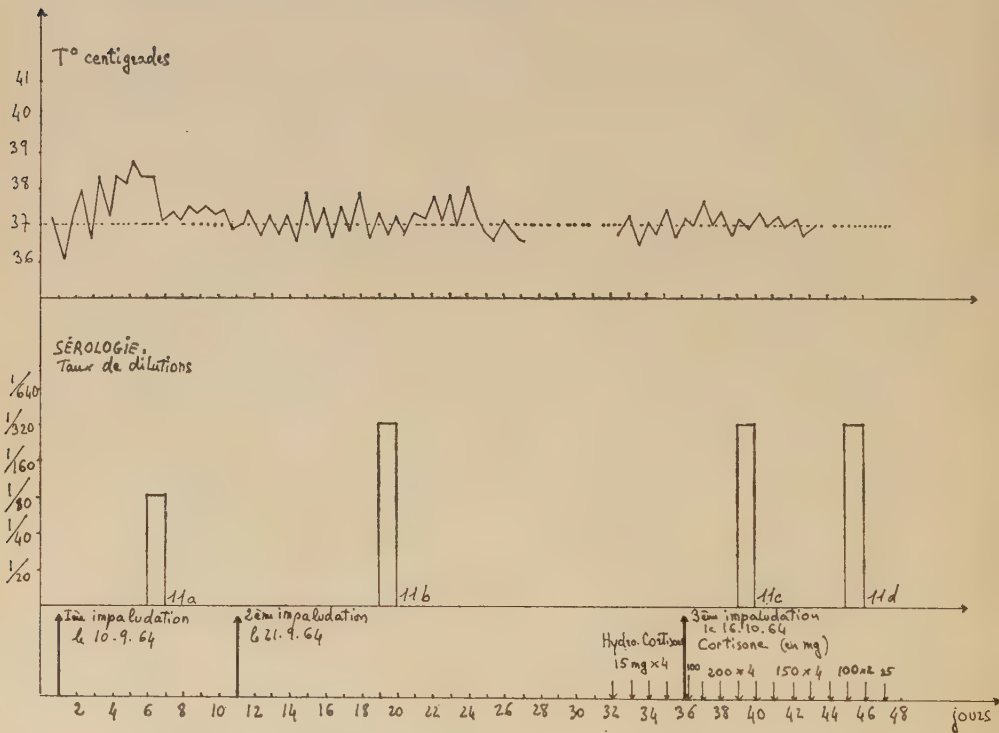
Malade hospitalisé pour maladie de BUERGER.

Dans les antécédents on note des accès palustres en Indochine (1950).

Trois tentatives d'impaludation ont été effectuées les 10-9-64, 21-9-64 et 16-10-64.

Toutes se sont soldées par des échecs.

Pourtant le malade avait été soumis à un traitement par les corticoïdes avant et après la 3^e inoculation.



— OBSERVATION N° 12 (Clinique des Maladies Infectieuses. 22 881):

M. MER..., 44 ans, également traité pour artérite de BUERGER.

L'interrogatoire est extrêmement difficile mais l'origine nord-africaine du sujet ne permet pas d'exclure l'existence d'antécédents palustres.

Première inoculation, le 25-5-64. Echec.

Nouvelle tentative le 30-6-64 qui n'entraîne que deux clochers thermiques à 38°5 et 39°4.

Après la deuxième inoculation, nous avons effectué des examens sérologiques qui sont résumés dans le tableau suivant :

Numéro des sérums	Date	Délai écoulé depuis la 2 ^e inoculation	Titres
12 a	9-7-64	9 jours	40
12 b	16-7-64	16 jours	320
12 c	21-7-64	21 jours	80
12 d	27-7-64	27 jours	80

— OBSERVATION N° 8 (déjà envisagée) :

M. DUC...

Ce malade avait, en juillet 1963, subi une première impaludation pour traitement d'une affection mentale.

En juillet et août 1964 on a procédé, à un mois d'intervalle, à deux nouvelles tentatives de réinoculation. Aucun résultat.

Une semaine après le deuxième essai, la réaction d'Immuno-fluorescence était positive à 1/80 (sérum n° 8 b). Le titre était déjà de 40 le jour de la première tentative, 13 mois après la première impaludation qui fut un succès (sérum n° 8 a).

COMMENTAIRES.

Chez ces trois malades, les échecs sont explicables par l'existence d'antécédents palustres certains (Observations n° 8 et 11) ou très probables (observation n° 12). Ceci rejoint ce que nous avons pu observer chez les singes et confirme diverses constatations cliniques déjà anciennes.

Il faut noter, par ailleurs, que si une impaludation par voie intra-musculaire assure une protection suffisante après

12 mois, un ancien paludéen « spontané » est réfractaire pour de nombreuses années (14 ans pour le malade n° 11).

La corticothérapie ne semble pas agir de façon sensible sur le taux des anticorps anti-Plasmodiums. En tout cas elle a été incapable de les abaisser jusqu'à un seuil suffisamment bas pour que l'obstacle sérologique puisse être franchi (échec de la 3^e inoculation du malade n° 11, pourtant sous corticoïdes).

Enfin des inoculations intra-musculaires répétées entraînent une nette augmentation du taux des anticorps fluorescents.

De tout ceci découle une conséquence pratique : la nécessité d'un contrôle sérologique avant toute tentative d'impaludation pour malariathérapie. Dans le cas de sujets déjà prémunis, il semble indispensable de recourir à l'infestation par l'Anophèle.

D. — RECHERCHE D'ANTICORPS ANTI-PLASMODIUMS AU COURS DE PALUDISMES SPONTANES

Nous avons voulu préciser la valeur diagnostique de notre technique d'Immuno-fluorescence chez des malades ayant présenté ou présentant des paludismes spontanés.

a) *Contrôle de spécificité.*

Dans un premier temps, nous avons vérifié la spécificité de notre méthode en étudiant :

— 5 sérums de syphilitiques dont le B.W. était positif ++ ou +++ ;

— 5 sérums prélevés chez des malades atteints d'hépatite virale au moment où les tests hépatiques étaient les plus perturbés ;

— enfin le sérum d'un sujet non paludéen, venant de recevoir 5 g de Quinine per os (1 g par jour pendant 5 jours consécutifs).

Aucun de ces sérums n'a été trouvé positif à 1/20.

Il ne semble pas exister de fausses réactions liées à la syphilis qui pourtant perturbe d'autres tests sérologiques (par l'Immuno-fluorescence, on peut donc suivre la courbe des anticorps anti-Plasmodiums au cours de malariathérapie pour syphilis nerveuse).

L'administration de Quinine ne semble pas elle non plus entraîner de fausses fluorescences.

Enfin la méthode de COONS n'est pas non plus faussée par les modifications sériques résultant d'une atteinte hépatique sévère (contrairement aux réactions de floculation).

b) *Valeur diagnostique de la réaction.*

Nous avons étudié les sérums de 12 malades ayant séjourné en zone d'endémie palustre.

1. Nous envisagerons tout d'abord les observations de 10 d'entre eux pour lesquels l'existence d'un paludisme a été vérifiée.

— OBSERVATION N° 13 (Clinique des Maladies Infectieuses. 22 985):

M. SCHAA..., 21 ans.

Au cours de son service militaire, ce malade effectue, pour la première fois, un séjour de 14 mois au Sénégal et en Côte d'Ivoire durant lequel il prend régulièrement de la Nivaquine.

Toujours en bonne santé pendant cette période, il présente à son retour un petit épisode fébrile pour lequel aucun examen n'est pratiqué.

Neuf mois plus tard, se déclenchent des accès fébriles à 40° C, accompagnés de frissons et de sueurs, se répétant tous les deux soirs.

Le malade est hospitalisé au cinquième accès, le 27-7-64.

L'examen clinique ne montre qu'une petite splénomégalie non sensible.

Examens de laboratoire :

A l'entrée, parasitémie importante à *P. vivax*, mise en évidence sur lame de sang colorée.

Numération globulaire : 5 800 000 hématies.

Réaction de Chorine : + 55.

Un traitement antipalustre est institué le lendemain. La courbe thermique se stabilise et la splénomégalie régresse. Deux mois après le malade est en bon état général.

Séro-diagnostic par Immuno-fluorescence :

Avant le début du traitement :

positif à 1/160 (13 a).

Cinq jours après :

positif à 1/320 (13 b).

— OBSERVATION N° 14 (Clinique des Maladies Infectieuses. 23 109) :

M. FER..., 24 ans.

Algérien, originaire de Bougie, ne présentant aucun antécédent de paludisme. Il séjourne en France depuis 1958, mais est retourné temporairement en Algérie en novembre et décembre 1963.

En septembre 1964, il est hospitalisé, présentant des accès thermiques à 40° C tous les soirs depuis une semaine, accompagnés de céphalées violentes, mais avec des sueurs modérées et sans frisson.

A l'entrée, la température est à 41°9 C.

L'examen clinique montre une splénomégalie nette.

Examens de laboratoire :

A l'entrée, infestation massive à *P. vivax* mise en évidence sur une lame de sang colorée.

Numération globulaire :

5 200 000 hématies à l'entrée.

4 440 000 hématies une semaine après.

Un traitement antipalustre est aussitôt institué. La courbe thermique se stabilise.

Séro-diagnostic par Immuno-fluorescence :

Le deuxième jour de traitement :

positif à 1/320 (14 a).

Dix jours plus tard :

positif à 1/80 (14 b).

douteux à 1/160.

— OBSERVATION N° 15 (Hôpital de la Croix-Rousse, consultation de Parasitologie. Pr. GARIN) :

M. ARG..., 23 ans.

Au cours de son service militaire, ce malade effectue, pour la première fois, un séjour de 9 mois en Algérie (Tebessa et frontière tunisienne).

Il ne signale aucun épisode fébrile durant cette période pendant laquelle il prend régulièrement de la Nivaquine à l'exception de deux ou trois périodes de quinze jours.

Entre le troisième et le seizième mois après son retour en France, le sujet présente 7 crises de paludisme. Des hématozoaires, dont l'espèce n'est pas précisée, auraient été mis en évidence.

Le malade vient consulter après la septième crise d'accès, le 11-7-64. L'examen clinique est entièrement négatif.

Examen de laboratoire :

Anémie relative à 3 850 000 globules rouges.

Un traitement antipalustre est prescrit.

Séro-diagnostic par Immuno-fluorescence :

Il est effectué trois mois après, le sujet étant revu à la Consultation en bon état général : positif à 1/80.

— OBSERVATION N° 16 (Clinique des Maladies Infectieuses. 23 118) :

Mlle ULR..., 41 ans.

Cette femme a vécu depuis 1952, 9 ans à Madagascar, 6 mois au Niger et 2 ans au Gabon jusqu'en septembre 1962, date de son retour en France.

Malgré un traitement prophylactique par la Nivaquine, elle a présenté plusieurs crises de paludisme en 1954, 1959, 1962 et au début de 1964, après son retour en France.

La malade est hospitalisée en septembre 1964 pour une histoire évocatrice d'une filariose à Loa-Loa : elle présente depuis mars 1964, des nodules sous-cutanés transitoires, et prurigineux, de type œdème de Calabar.

Examens de laboratoire :

Recherche de microfilaires dans le sang négative.

Eosinophilie à 42 %.

Numération globulaire : 4 890 000 hématies.

Séro-diagnostic du paludisme par immuno-fluorescence :

Le 2 octobre 1964 : positif à 1/80.

— OBSERVATION N° 17 (Hôpital de la Croix-Rousse, consultation de Parasitologie. Pr. GARIN) :

Mlle GIR..., 25 ans.

Cette malade a vécu en Côte d'Ivoire de 1961 à septembre 1964. Elle est revenue en France deux mois en 1963. Au cours de son séjour africain, elle a pris de la Nivaquine de façon irrégulière.

En 1961, elle a présenté des accès palustres qui se sont répétés en décembre 1963 ; suivis de quelques poussées fébriles irrégulières.

Depuis cette date elle est en bonne santé apparente.

Elle vient à la consultation pour une visite de contrôle, le 7-11-64. L'examen clinique est entièrement négatif.

Examens de laboratoire :

Examen de selles : nombreux œufs d'Ankylostome et de Trichocéphale.

Numération globulaire : 4 850 000 hématies.

Eosinophilie à 19 % (en rapport avec l'ankylostomose dont on ne retrouve dans les antécédents ni la phase cutanée ni la phase pulmonaire).

Séro-diagnostic par Immuno-fluorescence :

Le jour de la consultation :

positif à 1/80,

douteux à 1/160.

— OBSERVATION N° 18 (Hôpital de la Croix-Rousse, consultation de Parasitologie. Pr. GARIN) :

Mlle G..., 41 ans.

Aucun antécédent particulier n'est à noter chez cette malade avant son départ pour Bangui où elle effectue quatre séjours de deux ans pendant lesquels elle prend régulièrement de la Nivaquine (de 1954 à décembre 1963).

Au cours de son premier séjour, elle présente une crise de paludisme qui ne s'est pas renouvelée depuis.

Lors de son deuxième séjour, elle présente une crise de colique hépatique accompagnée d'ictère.

Aucun incident ne trouble le troisième séjour.

La malade est rapatriée sanitaire à la fin du quatrième séjour pour asthénie importante qui persiste dix mois plus tard et qui motive sa consultation.

L'examen clinique révèle une rate perçue à bout de doigts.

Examens de laboratoire :

Numération globulaire : 4 240 000 hématies.

Eosinophilie : à 11 % (la malade présente un tœniasis et émet des anneaux par intermittence).

Séro-diagnostic par Immuno-fluorescence :

Le jour de la consultation : positif à 1/160.

— OBSERVATION N° 19 (Hôpital de la Croix-Rousse, consultation de Parasitologie. Pr. GARIN) :

M. MON..., 44 ans.

Séjourne en zone endémique depuis 1948, revenant en France un mois par an.

— Maroc de 1948 à 1955.

— Mauritanie de 1955 à 1957.

— République Centre Africaine depuis 1957.

Malgré une prise quotidienne et régulière de Nivaquine, il présente en 1955 une première crise de paludisme dont la preuve parasitologique est alors faite.

En 1957, il présente de nouveau des accès thermiques isolés, brefs, accompagnés de céphalées, de vomissements et de frissons, mais non vérifiés du point de vue parasitologique.

Depuis, le malade continue à prendre régulièrement de la Nivaquine. Il n'a plus ressenti de crises de paludisme.

Par ailleurs il a contracté une amibiase en 1958, et il se plaint de troubles hépato-biliaires depuis un an pour lesquels il vient consulter en septembre 1964.

L'examen clinique est négatif.

Examens de laboratoire :

Bilan biologique normal.

Numération globulaire : 5 030 000 hématies.

Séro-diagnostic par Immuno-fluorescence :

Le jour de la consultation : positif à 1/320.

En dehors de ces 7 observations, nous avons trouvé des anticorps spécifiques dans les sérums des 3 malades suivants, pour lesquels nous ne disposons que de quelques renseignements fragmentaires.

— OBSERVATION N° 20 :

Enfant MAK..., 7 ans.

Hospitalisé pour primo-infection, il présente des accès palustres et des hématozoaires dans le sang périphérique le 24-2-64.

Séro-diagnostic par Immuno-fluorescence :

positif à 1/320.

— OBSERVATION N° 21 :

M. DJI...

Nord-Africain présentant des accès de paludisme depuis plus de un an. *Plasmodium vivax* est retrouvé sur une lame de sang coloré le 9-9-64.

Séro-diagnostic par Immuno-fluorescence :

positif à 1/640.

— OBSERVATION N° 22 :

M. TAL..., 34 ans.

Ce sujet, Nord-Africain, présente des accès fébriles à 40° C. Le diagnostic de paludisme est affirmé sur la vue de *Plasmodiums* dont l'espèce n'est pas précisée, sur une lame de sang. A cette occasion, nous avons eu à étudier un échantillon de sérum le 31-10-64.

Séro-diagnostic par Immuno-fluorescence :

positif à 1/320.

A partir de ces 10 examens sérologiques, il semble se dégager quelques notions à propos :

— *du taux des anticorps spécifiques au cours d'un paludisme en période d'accès.* Le titre est généralement assez élevé, allant de 160 (obs. 13) à 640 (obs. 21). Dans les autres cas, il est de 320 (obs. 14, 20 et 22) ;

— *de la persistance des anticorps anti-Plasmodiums chez les anciens paludéens.*

Chez tous ces sujets, la sérologie demeure positive, mais à des titres plus faibles comme le montre le tableau suivant.

Observations	Temps écoulé depuis le dernier accès en mois	Titres
15	3 mois	80
16	8 mois	80
17	11 mois	80
18	10 ans	160
19	7 ans	320

Les titres plus élevés observés pour les malades 18 et 19, dont les derniers accès sont pourtant anciens, s'expliquent sans doute par les longs séjours de ces sujets en zone d'endémie palustre, M. MON... (obs. 19) vivant toujours actuellement en République Centre Africaine et ne revenant que 3 mois par an en France. Dans de tels cas, les sujets sont soumis à des réinfestations fréquentes qui maintiennent les anticorps à un taux élevé.

2. Chez deux de nos malades nous n'avons pu mettre en évidence de façon certaine l'existence d'antécédents palustres.

Voici leurs observations.

— OBSERVATION N° 23 (Clinique des Maladies Infectieuses. 22 947):

M. MEN..., 31 ans.

Il s'agit d'un Noir né à Dakar, résidant en France depuis 1961.

Il est hospitalisé en juillet 1964 pour un abcès de la fesse gauche à répétition, en bon état général par ailleurs.

L'interrogatoire, très difficile, ne permet pas de mettre en évidence de façon certaine des antécédents de paludisme.

L'examen clinique est négatif.

Examens de laboratoire :

Numération globulaire : 4 940 000 hématies.

Eosinophilie à 21 %.

Gono-réaction douteuse (1 unité de complément déviée).

B.W. et Kahn négatifs, mais V.D.R.L. positif ++.

Séro-diagnostic par Immuno-fluorescence :

Au cours de l'hospitalisation : positif à 1/160.

— OBSERVATION N° 24 (Hôpital de la Croix-Rousse, consultation de Parasitologie. Pr. GARIN) :

M. COU..., 31 ans.

Au cours de son service militaire, il effectue, pour la première fois, un séjour de deux ans en Algérie durant lequel il prend de la Nivaquine par intermittence. A part de fréquents accès diarrhéiques, aucun antécédent n'est à signaler.

Depuis son retour en France, qui remonte à 5 ans, le malade a présenté tous les ans un épisode fébrile se manifestant par deux ou trois accès thermiques accompagnés de frissons et de sueurs. La preuve parasitologique du paludisme n'a jamais pu être faite.

Le malade vient consulter au décours d'une nouvelle crise. Il se plaint de céphalées sans cause décelable.

L'examen clinique est entièrement négatif.

Séro-diagnostic par Immuno-fluorescence :

Le jour de la consultation :

positif à 1/40 ++,

douteux à 1/80.

Compte tenu des résultats que nous avons obtenus par l'Immuno-fluorescence, un paludisme antérieur est certain pour M. MEN... (obs. 23), d'autant plus qu'il s'agit d'un noir ayant vécu à Dakar jusqu'en 1961.

Quant aux épisodes fébriles de M. COU... (obs. 24), ils sont très probablement à rattacher au paludisme.

En effet, en dehors des témoins que nous avons déjà signalés, nous avons analysé au total 35 sérums de sujets sains. Tous ont été négatifs dès le 1/20.

Nous considérons donc comme significatifs les titres des sérums 23 et 24.

Apports de l'Immuno-fluorescence à la compréhension de l'immunologie paludéenne

Il a pratiquement fallu attendre l'Immuno-fluorescence pour que puisse être entreprise une étude valable de la sérologie du paludisme. Les résultats déjà fournis par la méthode de COONS nous amènent à considérer sous un angle nouveau certains aspects théoriques et pratiques de l'immunologie paludéenne.

I. — D'un point de vue théorique, l'un des apports les plus intéressants concerne le problème de l'immunité acquise après un paludisme de primo-infestation. En fait, cette notion existe depuis déjà longtemps, mais il fallait, pour la préciser, pouvoir titrer quantitativement des anticorps anti-Plasmodiums. On sait maintenant que ces anticorps se maintiennent, à un taux relativement élevé, plusieurs années après un paludisme spontané.

Il se constitue ainsi une « barrière sérologique » qui semble pratiquement infranchissable lors d'une tentative d'impaludation par injection intra-veineuse ou intra-musculaire (même si on inocule des quantités très importantes de Plasmodiums ou si on soumet le malade à une corticothérapie préalable).

Dans le cas d'une réinfestation par l'Anophèle, cet obstacle existe aussi, mais, comme de nombreuses observations cliniques et épidémiologiques l'ont montré depuis longtemps, il est assez facilement franchi.

A la suite d'une première contamination palustre on pourrait donc parler d'immunité véritable face à une inoculation « à la seringue » et seulement de prémunition pour une réinfestation par le moustique,

II. — Par ailleurs, au vu des résultats acquis, on peut supposer que la réponse immunitaire lors du paludisme, spontané ou non, possède une origine double :

— les formes plasmodiales tissulaires (cryptozoïtes) induisant l'élaboration d'anticorps à un taux modéré mais persistant plusieurs années ;

— les schizontes du sang périphérique entraînent au contraire une augmentation importante mais fugace du taux des anticorps.

Il ne s'agit là, en fait, que d'une hypothèse qui, pour être vraisemblable, n'en demande pas moins à être solidement étayée par de nouvelles études. On pourrait, pour tenter de la vérifier, suivre la sérologie de sujets impaludés expérimentalement (par l'anophèle ou non) et soumis à des traitements actifs sur les formes tissulaires ou sur les plasmodiums intra-érythrocytaires.

III. — L'identité immunologique de *Plasmodium cynomolgi bastianellii* et de *Plasmodium vivax* est également remarquable. Les résultats sérologiques obtenus à partir de sérums humains anti-P. *vivax* et de sérums de singe anti-P. *c. bastianellii* étudiés simultanément avec ces deux *Plasmodiums*, révèlent une stricte concordance des titres obtenus avec l'une ou l'autre des deux espèces. Est-il donc possible d'identifier *Plasmodium vivax* et *Plasmodium cynomolgi bastianellii* ? Nous serions tenté de répondre par l'affirmative.

Du point de vue morphologique, il n'existe que peu de différences entre ces espèces, sauf peut-être en ce qui concerne les formes de reproduction intra-hépatiques. La similitude est telle que la confusion a été possible comme dans ces paludismes accidentels, apparus dans des laboratoires d'Amérique, et qui auraient été étiquetés « paludisme à P. *vivax* » si des considérations épidémiologiques et surtout la présence d'une souche de *Plasmodium cynomolgi bastianellii* dans le laboratoire, n'avaient fait rectifier le diagnostic.

La pathogénicité des deux *Plasmodiums* est sensiblement la même pour l'homme et pour le singe, qui peuvent être également infestés par les deux espèces. Par contre, le paludisme humain à *P. c. bastianellii* est beaucoup moins aigu que l'infection à *P. vivax* : la parasitémie est moindre, les accès peu nombreux disparaissent sans traitement. Toutefois cette différence peut être rapportée à une adaptation insuffisante de *P. c. bastianellii* à l'organisme humain. - Il serait intéressant, à cet égard, de suivre l'évolution clinique et parasitémique après plusieurs passages successifs Anophèle - Homme - Anophèle - Homme.

Si l'hypothèse de l'identité de *Plasmodium cynomolgi bastianellii* et de *Plasmodium vivax* était confirmée, les singes pourraient être considérés comme un réservoir de virus sauvage et l'on se trouverait, pour le paludisme, devant le même complexe épidémiologique que pour la fièvre jaune avec l'association Singes-Aedes. Ceci expliquerait peut-être une partie des échecs d'éradications basées uniquement sur la lutte contre les moustiques urbains. Du même coup la position des épidémiologistes français qui considèrent que la destruction des Anophèles doit se doubler de chimio-prophylaxie recevrait une nouvelle justification.

Tout ceci ne correspond, bien sûr, qu'à une hypothèse. Les données récentes de l'Immuno-fluorescence la rendent toutefois suffisamment vraisemblable pour que nous croyons utile de la mentionner comme une base possible de travail.

IV. — Sur le plan pratique, il est maintenant possible, par la méthode de COONS, de suivre l'évolution sérologique au cours d'un traitement. Une telle étude réalisée chez des singes infestés et soumis à différents anti-paludéens de synthèse, permettrait de préciser quels sont ceux des médicaments susceptibles de négativer totalement la réponse immunitaire, prouvant une guérison totale.

V. — Enfin, quelles sont les possibilités de l'Immuno-fluorescence comme méthode pratique de diagnostic du paludisme ? Comme pour la sérologie virale, c'est l'évolution sérologique qui apporte des arguments interprétables.

Plusieurs cas peuvent être envisagés :

a) Une augmentation progressive des taux signe un paludisme en début d'évolution justifiant la mise en route d'un traitement.

b) Si les taux se maintiennent à un faible niveau, il s'agit très certainement d'un paludisme ancien. Le problème se pose alors de savoir si le malade peut être considéré comme guéri, ou bien au contraire si, le titre en anticorps étant descendu au-dessous d'un certain seuil, les accès ne risquent pas de réapparaître. Aucune donnée actuelle ne nous permet de déterminer le taux protecteur.

c) Enfin des titres élevés successifs correspondent à la période des accès et ne viennent que confirmer les données de la clinique et de l'examen de sang. C'est dans le cas où un traitement a fait disparaître les hématozoaires, que l'Immuno-fluorescence prend toute sa valeur diagnostique.

VI. — L'Immuno-fluorescence doit remplacer les autres méthodes précédemment utilisées, et doit, pour les années à venir, représenter la « méthode » de séro-diagnostic du paludisme, jusqu'au jour où une autre technique, plus sensible, plus pratique, plus spécifique, sera mise à notre disposition.

CONCLUSIONS

I. — Le séro-diagnostic du paludisme humain a été autrefois tenté par les méthodes habituelles de sérologie. Actuellement l'Immuno-fluorescence semble prévaloir. L'analyse de ces différents travaux montre en effet la très grande supériorité de la technique de COONS. Contrairement aux autres méthodes, elle n'est pas liée à l'extraction d'un antigène plasmodial difficile à obtenir.

II. — Nous appuyant sur ces résultats, nous nous sommes adapté aux conditions géographiques locales. En effet, l'Immuno-fluorescence exige, comme antigène, l'utilisation de sangs humains très richement parasités : de tels sangs sont rares à Lyon. Nous avons donc tourné la difficulté en utilisant *Plasmodium cynomolgi bastianellii*, qui donne des réactions croisées avec les hématozoaires humains.

Cela nous a conduit à tenter l'impaludation de 12 singes *Macaca irus cynomolgus* d'origine africaine, le plus souvent sans succès. A cette occasion nous avons ébauché l'étude immunologique du paludisme expérimental du singe. Nos résultats confirment la très grande parenté des gammaglobulines de l'homme et du singe. Ils ont mis en évidence un certain degré de prémunition probablement responsable de plusieurs de nos échecs.

Ce sont finalement des étalements de sang de *Macaca mulata rhésus* d'origine asiatique, parasités par *Plasmodium cynomolgi bastianellii*, que nous avons utilisés comme antigène pour l'étude du paludisme humain.

III. — Les réactions croisées entre *Plasmodium vivax* et *Plasmodium cynomolgi bastianellii* ont été vérifiées à

propos de 10 sérums de paludéens et de 3 sérums témoins, tous pris à 6 dilutions différentes. Dans tous les cas les titres en anticorps fluorescents ont été identiques.

IV. — Par la méthode que nous proposons, nous avons suivi l'évolution sérologique de 12 malades subissant une malariathérapie à *Plasmodium vivax* par injection. La réaction devient positive vers le dixième jour (au 1/40), atteint un titre maximum (entre 320 et 640) vers le trentième jour, puis décroît rapidement pour rester toutefois faiblement positive pendant plusieurs mois.

V. — Enfin nous avons analysé les sérums de 12 malades présentant ou ayant présenté des paludismes « spontanés ». Nous avons pu ainsi évaluer le taux des anticorps fluorescents qui, au cours d'un accès palustre, peut monter au 1/640, et préciser la durée et l'importance de la réponse immunologique chez d'anciens paludéens, pouvant donner une sérologie positive au 1/40 après 5 ans.

Au total, la technique que nous proposons a donné des résultats très satisfaisants dans l'étude de 55 sérums positifs et de 35 sérums témoins négatifs. Aucune réaction croisée n'a été notée avec la syphilis, l'hépatite virale ou des sérums de sujets sains ayant reçu de la Quinine. Nous pensons, dans un avenir proche, pouvoir utiliser cette méthode comme un procédé de routine pour le séro-diagnostic du Paludisme.

Le Doyen,
J.-F. CIER

Le Président de la Thèse,
J. COUDERT.

Vu et permis d'imprimer : Lyon, le 4 Décembre 1964.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

- AMBROISE-THOMAS (P.). — L'Immuno-fluorescence dans le diagnostic direct et indirect des Parasitoses : Applications à la Toxoplas-mose. *Thèse Médecine*, Lyon, 1963, 160 pages, 115 références.
- BANKI (G.) et BUCCI (A.). — The antigenic composition of *Plasmo-dium berghei*.
— Antigenic composition of *Plasmodium cynomolgi* and its relation to the antigenic composition of *Plasmodium berghei*.
Communications au Congrès International de Parasitologie, Rome 1964. A paraître dans *Parassitologia*.
- BASU (P.C.) et STAYA PRAKASH. — The course of Parasitaemia of *Plas-modium cynomolgi bastianellii* in Macacca Mulatta Monkeys : its sensitivity to different antimalarials. *Indian J. Malarialogy*, 16 : 321-326, 1962.
- BEUTNER (E.H.). — Immunofluorescent staining the fluorescent anti-body method. *Bact. Rev.*, 25 : 49-76, 1961.
- BOREK (F.). — The fluorescent antibody method in Medical and Bio-logical Research. *Bull. O.M.S.*, 24 : 249-250, 1961.
- BOREL (L.J.) et DUREL (P.). — L'Immuno-fluorescence : ses possibi-lités en Parasitologie. *Path. Biol.*, 8 : 65-68, 1960.
- BRAY (R.S.). — The fluorescent antibody test for malarial antibody using small amounts of blood. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 56 : 436, 1962.
- CHERRY (W.B.), GOODMAN (M.) et CARSKI. — Fluorescent antibody technic in the diagnostic of communicable diseases. *Atlanta-Communicable disease center*, 1960.
- CHORINE (V.). — La réaction de Henry n'est due qu'à des modifica-tions quantitatives dans le sérum. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 31 : 838-840, 1938.
- CHORINE (V.) et KÆCHLIN (D.). — Diagnostic du paludisme, par mesure de l'instabilité du sérum dans l'eau distillée. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 28 : 375-378, 1935.

- CHORINE (V.), PRUDHOMME (R.) et KÆCHLIN (D.). — Flocculation du sérum dans l'eau distillée et réaction de Henry. *Ch. Soc. Biol.*, 116 : 1255-1257, 1934.
- COCHRANE (C.G.). — La technique des anticorps fluorescents. Applications à la microbiologie et au phénomène d'Arthus. *Annales de l'Institut Pasteur*, 99, n° 3 : 330-349, 1960.
- COGGESHALL (L.T.) et EATON (M.D.). — The complement fixation reaction in Monkey Malaria. *J. Exp. Med.*, 67 : 871-882, 1938.
- COHEN (S.), Mc GREGOR (I.A.) et CARRINGTON (S.). — Gamma-globulin and Acquired Immunity to human Malaria. *Nature*, 192 : 733-737, 1961.
- COLLINS (W.E.), JEFFERY (G.M.) et SKINNER (J.C.). — Fluorescent antibody studies in human Malaria. I. Development of antibodies to Plasmodium Malariae. *The Am. J. of Trop. Med. and Hyg.*, 13 : 1-5, 1964.
- COLLINS (W.E.), JEFFERY (G.M.) et SKINNER (J.C.). — Fluorescent antibody studies in human Malaria. II. Development and persistence of antibodies to Plasmodium falciparum. *The Am. J. of Trop. Med. and Hyg.*, 13 : 256-260, 1964.
- COONS (A.H.). — The diagnostic application of fluorescent antibodies. *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, 22 : 693-699, 1959.
- CORRADETTI (A.), VEROLINI (F.), SEBASTIANI (A.), PROIETTI (A.M.) et AMATI (L.). — Fluorescent antibody testing with sporozoites of Plasmodia. *Bull. O.M.S.*, 30 : 747-750, 1964.
- COUDERT (J.). — Antigènes lyophilisés en Parasitologie. *Presse Médicale*, 52 : 1080-1081, 1955.
- COUDERT (J.). — Utilisation des antigènes lyophilisés pour le diagnostic des maladies parasitaires. *Ann. Biol. Clin.*, 12 : 1-9, 1961.
- DAVIS (B.D.). — Complement fixation with soluble antigen of Plasmodium knowlesi and Plasmodium lophurae. *J. Immunol.*, 58 : 269, 1948.
- DE BLASI (D.). — Sulla deviazione del complemento nella malaria umana. *Ann. Igiene Sper. NS.*, 17 : 677-687, 1907.
- DULANEY (A.D.) et HOUSE (V.). — Precipitative tests in malaria. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, 48 : 620, 1941.
- DULANEY (A.D.) et MORRISON (D.B.). — On preparation and properties of antigens from Plasmodium knowlesi. *The Am. J. of Med.*, 24 : 323-326, 1944.
- DULANEY (A.D.) et STRATMAN-THOMAS (W.K.). — Complement fixation in human malaria. Results obtained with various antigens. *J. Immunol.*, 39 : 247, 1940.

- DULANEY (A.D.), STRATMAN-THOMAS (W.K.) et WARR (O.S.). — Complement fixation in malaria with special reference to the diagnosis of naturally acquired infections. *J. Bact.*, 41 : 66, 1941.
- DULANEY (A.D.), STRATMAN-THOMAS (W.K.) et WARR (O.S.). — The diagnostic value of complement fixation in malaria. *J. Inf. Dis.*, 70 : 221-225, 1942.
- DULANEY (A.D.) et WATSON (R.B.). — Complement fixation in relapsing *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med.*, 25 : 473-480, 1945.
- DULONG DE ROSNAY (C.) et BOINEAU (J.). — Une méthode d'investigation immunologique d'intérêt général : l'Immuno-fluorescence. *Journ. Méd. Bordeaux*, 10 : 1453-1470, 1962.
- EATON (M.D.). — The agglutination of *Plasmodium knowlesi* by immune serum. *J. Exp. Med.*, 67 : 857-870, 1938.
- EATON (M.D.) et COGGESHALL (L.T.). — Complement fixation in human malaria, with an antigen prepared from the Monkey parasite *Plasmodium knowlesi*. *J. Exp. Med.*, 69 : 379-398, 1939.
- EYLES (D.E.), COATNEY (R.G.) et GETZ (M.E.). — Vivax-type malaria parasite of Macaques transmissible to man. *Science*, 131 : 1812-1813, 1960.
- FERRANNINI (L.). — La formazione di anticorpi specifici e la fissazione del complemento nella malaria. *Riforma Med.*, 7 : 177-178, 1911.
- FRIBOURG-BLANC (A.), NIEL (G.) et MOLLARET (H.H.). — Note sur quelques aspects immunologiques du Cynocéphale Africain. Parenté antigénique de ses gamma globulines avec les gamma globulines humaines. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 56 : 474-485, 1963.
- GARIN (J.P.) et AMBROISE-THOMAS (P.). — Le diagnostic sérologique de la toxoplasmose par la méthode des anticorps fluorescents (Technique indirecte). *La Presse Médicale*, 52 : 2485-2488, 1963.
- GARNHAM (P.C.C.). — New sub-species of *Plasmodium cynomolgi*. *Riv. Parassit.*, 20 : 273-278, 1959.
- GASBARRINI (A.). — Das Bordet-Gengoushe Phänomen (Komplementablenbrung) bei Malaria. *Ztschr. Immunitätsf.*, 20 : 178-197, 1913.
- GOLDWASSER (R.A.) et SHEPARD (C.C.). — Staining of complement and modification of fluorescent antibody procedures. *J. Immunol.*, 80 : 122-131, 1957.

- GROSPIRON (D.). — Etude des techniques d'Immuno-fluorescence appliquées au diagnostic sérologique des Tréponématoses. *Thèse Pharmacie* Lyon, 1962.
- HARRIS (A.D.) et REIDEL (L.M.). — Evaluation of the complement fixation test for Malaria. *Amer. J. Trop. Med.*, 28 : 787-795, 1948.
- HENRY (A.F.X.). — Contribution à l'étude sérologique de l'infection palustre. *Rapport au Congrès pour l'Avancement des Sciences de Constantine*, avril 1927.
- HENRY (A.F.X.). — Sur la théorie et les principes du séro-diagnostic du Paludisme. Etude critique. *Rev. Malar.*, 33 : 88-89, 1954.
- HORROWITZ-WLASSOWA (L.). — Experimentelle Beiträge zur Frage der Malaria-immunität (spezifische Komplementablenkungsreaktion bei Malaria). *Ztschr. f. Immunitätsf.*, 40 : 268-277, 1924.
- INGRAM (R.L.) et CARVER (R.K.). — Malaria parasites : Fluorescent antibody technic for tissue stage study. *Science*, 139 : 405-406, 1963.
- INGRAM (R.L.), OTKEN (L.B.) et JUMPER (J.R.). — Staining of malarial parasites by the fluorescent antibody technic. *Proc. Soc. Exper. Biol. et Med.*, 106 : 52-54, 1961.
- KINGBURY (A.N.). — Some investigations of malarial fever. IV. The complement fixation reaction. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 20 : 359-364, 1927.
- KLIGER (I.J.) et YELI (M.). — The diagnostic and epidemiological significance of the complement fixation test in human malaria. *Am. J. Trop. Med.*, 21 : 531, 1941.
- KRATCHKO (A.). — La recherche des auto-anticorps antinucléaires par la technique quantitative d'Immuno-fluorescence. *Thèse Médecine* Lyon, 1961.
- KREIER (J.P.) et RISTIC (M.). — Detection of a plasmodium berghei-antibody complex formed in vivo. *The Am. J. of Trop. Med. and Hyg.*, 13 : 6-10, 1964.
- KUVIN (S.F.), TOBIE (J.E.), EVANS (C.B.), COATNEY (G.R.) et CONTACTOS (P.G.). — Antibody production in human malaria as determined by the Fluorescent Antibody technic. *Science*, 135 : 1130-1131, 1962.
- KUVIN (S.F.), TOBIE (J.E.), EVANS (C.B.), COATNEY (G.R.) et CONTACTOS (P.G.). — Fluorescent antibody studies on the course of antibody production and serum gammaglobulin levels in normal volunteers infected with human and simian malaria. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.*, 11 : 429-436, 1962.

- KUVIN (S.F.), TOBIE (J.E.), EVANS (C.B.), COATNEY (G.R.) et CONTACOS (P.G.). — Production of malarial antibody. Determination by the fluorescent antibody technic. *J. Amer. Med. Ass.*, 184 : 943-945, 1963.
- KUVIN (S.F.) et VOLLER (A.). — Malarial antibody titres of West-Africans in Britain. *Brit. Med. J.*, 24 : 477-479, 1963.
- LE BOURDELLES (B.) et LIEGEOIS (R.). — Sur la séro-floculation du paludisme. Les conditions de la réaction. Facteurs non spécifiques de sensibilisation et facteurs spécifiques. *C.R. Soc. Biol.*, 101 : 466-468, 1929.
- LIPPINCOTT (S.W.), GORDON (H.H.), HESSEL-BROCK (W.B.) et MARBLE (A.). — Complement fixation in human malaria using an antigen prepared from the chicken parasite : *Plasmodium gallinaceum*. *J. Clin. Invent.*, 24 : 362-371, 1945.
- MANSON-BAHR (P.). — Researches upon the production of malaria antigen for a complement deviation test. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 21 : 63, 1927.
- MAYER (H.H.) et HEIDELBERGER. — Studies in malaria. V. Complement fixation reactions. *J. Immunol.*, 54 : 89-102, 1946.
- MEERSSEMAN (F.) et LACOUR (P.R.). — La séro-floculation du paludisme (réaction de Henry). Sa technique. Sa valeur. Son mécanisme. *La Presse Médicale*, 49 : 995-998, 1934.
- NAIRN (R.C.). — Marquage des protéines par fluorescence et méthode des anticorps fluorescents. *Endeavour*, 20 : 78-84, 1961.
- NAIRN (R.C.). — Fluorescent protein tracing. R.C. Nairn Editor, Edinburgh and London, 280 pages, 1962.
- NICHOLS (R.L.) et MC COMB (D.E.). — Immuno-fluorescence studies with Trachoma and related antigens. *J. Immunol.*, 82 : 544-545, 1962.
- NIEL (G.) et FRIBOURG-BLANC (A.). — Technique actuelle du test d'Immuno-fluorescence appliqué au diagnostic de la syphilis. *Ann. Institut Pasteur*, 102 : 616-628, 1962.
- PEWNY (W.). — Präzipitinversuche bei Malaria. *Wein Klin. Wschr.*, 31 : 205-206, 1918.
- REIN (C.R.), BUKANTZ (S.C.), KENT (J.F.), COOPER (W.C.), RUHE (D.S.) et COATNEY (G.R.). — Studies in malaria : XIX : The course of the complement — fixation reaction in sporozoïte — induced Saint-Elizabeth strain vivax malaria. *Am. J. Hyg.*, 49 : 374-384.

- ROCHE (S.). — Contribution à l'étude fonctionnelle hépatique dans le paludisme aigu : malariathérapie. *Thèse Médecine* Paris, 1963.
- ROW (R.). — Precipitin reaction in malarial sera. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 24 : 623-628.
- SADUN (E.H.), WILLIAMS (J.S.) et ANDERSON (R.I.). — Fluorescent antibody technic for sero-diagnosis of Schistosomiasis in Humans. *Proc. Soc. Exp. Biol. et Med.* (N.Y.), 105 : 289-291, 1960.
- SADUN (E.H.), WILLIAMS (J.S.) et ANDERSON (R.I.). — The nature of fluorescent antibody and artificial immunization with Schistosoma mansoni. *Bull. O.M.S.*, 27 : 151-159, 1962.
- SCHNEIDER (J.). — P. cynomolgi bastianellii : hématozoaire du Singe transmissible à l'homme. Essai d'impaludation thérapeutique. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 54 : 7-11, 1961.
- SCHNEIDER (J.) et HARTMAN (L.). — Paludisme et réaction de Henry. La réaction de Henry dans le diagnostic du paludisme. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 48 : 552-564, 1955.
- SPIRA (D.) et ZUCKERMAN (A.). — The antigenic structure of Plasmodium vinckeï. *Science*, 137 : 536-537, 1962.
- STEIN (B.) et DESOWITZ (R.S.). — The measurement of antibody in human malaria by a formalized tanned sheep cell hemagglutination test. *Bull. O.M.S.*, 30 : 45-49, 1964.
- STADTSBAEDER (S.), TELLIER-VERMEYEN (N.) et WEBER (M.). — Diagnostic sérologique de la toxoplasmose par l'Immuno-fluorescence. *Acta Clinica Belgica*, 3 : 161-166, 1964.
- STRATMAN-THOMAS (W.K.) et DULANEY (A.D.). — Immunologie studies in malaria with special reference to the diagnostic of malaria. *Am. Journ. Trop. Med.*, 20 : 117, 1940.
- STRATMAN-THOMAS (W.K.) et DULANEY (A.D.). — Complement fixation in human malaria. I. Diagnostic Application. *J. Immunol.*, 39 : 257, 1940.
- TALIAFERRO (W.H.). — The immunology of parasitic infections. The Century Co., New-York 1929.
- TALIAFERRO (W.H.) et TALIAFERRO (L.G.). — A precipitin test in malaria. *J. Prev. Med.*, 2 : 147-167, 1928.
- TALIAFERRO (W.H.), TALIAFERRO (L.G.) et FISHER (A.B.). — A precipitin test in malaria. *J. Prev. Med.* (Baltimore), 1 : 343-357, 1927.
- THIVOLET (J.), KRATCHKO (A.) et SEPETDJAN (M.). — Utilisation de la méthode d'Immuno-fluorescence pour le diagnostic immunologique. *La Presse Médicale*, 55 : 2470-2472, 1963.

- THOMSON (J.G.). — Experiments on the complement fixation in malaria with antigens prepared from cultures of malarial parasites (*P. falciparum* et *P. vivax*). *Proc. Roy. Soc. Med.*, 12 : 39-48, 1919.
- TOBIE (J.E.). — Certain technical aspects of fluorescence microscopy and the Coons fluorescent antibody technic. *J. Histochem. et Cytochem.*, 6 : 271-277, 1958.
- TOBIE (J.E.). — Detection of malaria-antibodies : Immunodiagnosis. *The Am. J. of Trop. Med. and Hyg.*, 13 : 195-203, 1964.
- TOBIE (J.E.). — The relationship of parasitemia to the antibody responses in human malaria. Communication au Congrès International de Parasitologie à Rome, 1964. A paraître dans *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*
- TOBIE (J.E.) et COATNEY (G.R.) with the technical assistance of EVANS (C.B.). — Fluorescent antibody staining of human malaria parasites. *Exper. Parasit. New-York*, 11 : 128-132, 1961.
- TOBIE (J.E.), KUVIN (S.F.), CONTACOS (P.G.), COATNEY (G.R.) et EVANS (C.B.). — Fluorescent antibody studies on cross relations between human and simian malaria in normal volunteers. *Amer. J. Trop. Med. and Hyg.*, 11 : 589-596, 1962.
- TOBIE (J.E.), KUVIN (S.F.), CONTACOS (P.G.), COATNEY (G.R.) et EVANS (C.B.). — Cross reactions in human and simian malaria. *J. Amer. Med. Ass.*, 184 : 945-947, 1963.
- VOLLER (A.). — Fluorescent antibody studies on malaria parasites. *Bull. O.M.S.*, 27 : 283-287, 1962.
- VOLLER (A.). — Fluorescent antibody methods and their use in malaria research. *Bull. O.M.S.*, 30 : 343-354, 1964.
- VOLLER (A.) et BRAY (R.S.). — Fluorescent antibody staining as a measure of malarial antibody. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 110 : 907-910, 1962.
- VOLLER (A.) et TAFFS (L.F.). — Fluorescent antibody staining of exoerythrocytic stages of *Plasmodium gallinaceum*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 57 : 32-33, 1963.
- VOLLER (A.) et WILSON (H.). — Immunological aspects of a population under prophylaxis against malaria. *Brit. Med. J.*, ii : 551-552, 1964.
- WOLFF (E.K.). — Buffer precipitation test (B.P.T.) for malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 32 : 707-716, 1939.
- ZUCKERMAN (A.). — The antigenic analysis of *Plasmodia*. *The Am. J. of Trop. Med. and Hyg.*, 13 : 209-213, 1964.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	15
PREMIERE PARTIE. — L'immunologie du paludisme par les méthodes de sérologie classique	19
I. — La sérologie non spécifique : les réactions de floculation ..	21
II. — La sérologie spécifique	27
1. La réaction de fixation du complément	27
2. Les réactions de précipitation et d'agglutination	33
DEUXIEME PARTIE. — L'Immuno-fluorescence dans l'immu- nologie paludéenne	41
<i>Chapitre I.</i> — Applications de la méthode directe	45
<i>Chapitre II.</i> — Applications de la méthode indirecte	53
I. Travaux antérieurs	53
1. Etude synthétique des méthodes utilisées	53
2. Résultats obtenus	57
A. Courbes des anticorps spécifiques au cours de paludismes expérimentaux	58
B. Réponses immunologiques à la suite de paludismes spontanés ..	65
II. Travaux personnels	67
1. Essai de mise au point de la méthode indirecte	67
A. Eléments matériels	67
L'antigène	67
Les sérums à étudier	74
Le conjugué	76
L'installation optique	82

B. Technique proposée	85
2. Résultats personnels	89
A. Tentatives d'impaludation de singes cynomolgus	89
B. Réactions croisées entre <i>P. vivax</i> et <i>P. c. bastianellii</i>	98
C. Evolution sérologique de paludismes expérimentaux à <i>P. vivax</i>	100
D. Recherche d'anticorps anti-Plasmodiums au cours de paludismes spontanés	110
III. Apports de l'Immuno-fluorescence à la compréhension de l'immunologie paludéenne	120
CONCLUSIONS	125
BIBLIOGRAPHIE	127

TRAVAIL DE LA CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET PATHOLOGIE EXOTIQUE
DE LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

